

Totvolumenfreie Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Nanoelektrospray- Massenspektrometrie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



Universität Regensburg

von

Peter Hoffmann

Regensburg, im Juni 2009

Diese Arbeit entstand von

September 2005 bis Juni 2006 in der Abteilung Chromatographie
am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr,

Juli 2006 bis September 2007 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
der Universität Regensburg,

Oktober 2007 bis Juni 2009 am Institut für Analytische Chemie
der Universität Leipzig

unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Detlev Belder.

Anmeldung zur Promotion: 5. Juni 2009

Kolloquiumstermin: 26. Juni 2009

Prüfungsausschuss

Vorsitzender: Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis

Erstgutachter: Prof. Dr. Detlev Belder

Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank-Michael Matysik

Drittprüfer: Prof. Dr. Achim Göpferich

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Detlev Belder, vor allem für die intensive wissenschaftliche Betreuung, sein großes Vertrauen und die gegebene Selbständigkeit und Zuversicht während meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Frank-Michael Matysik danke ich besonders für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke dem Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis und dem Drittprüfer Prof. Dr. Achim Göpferich für ihre Teilnahme am Kolloquium.

Meinen ehemaligen Kollegen in der Abteilung Chromatographie am Max-Planck-Institut in Mülheim a. d. Ruhr und am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg danke ich für die vielfältige Unterstützung beim Meistern der täglichen Herausforderungen im Labor.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstätten des Max-Planck-Instituts in Mülheim a. d. Ruhr und der Universität Regensburg, die durch ihren Erfindergeist maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Kollegen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Detlev Belder am Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig danke ich für viele anregende Diskussionen und die experimentelle Hilfestellung.

Ganz besonderer Dank gebührt Philipp Schulze, der während der Doktorandenzeit zu einem guten Freund geworden ist.

Zu guter Letzt danke ich meinen lieben Eltern, für alles was sie für mich waren und sind.

la vie est belle - das Leben ist schön
französische Redensart

Veröffentlichungen

Peter Hoffmann, Markus Eschner and Detlev Belder

Spray Performance of Glass Microfluidic Devices with Integrated Pulled Nanoelectrospray Emitters

Analytical Chemistry **2009**, *submitted*

Peter Hoffmann, Ulrich Häusig, Philipp Schulze and Detlev Belder

Microfluidic Glass Chips with an Integrated Nanospray Emitter for Coupling to a Mass Spectrometer

Angewandte Chemie International Edition **2007**, 46, 4913-4916

Peter Hoffmann and Detlev Belder

Microfluidic Glass Chips with Integrated Nanoelectrospray Emitters for Ultra High Speed CE-MS Coupling

Vortrag, 25th LC/MS Montreux Symposium, 12.-14. November **2008**, Montreux/Schweiz

Peter Hoffmann and Detlev Belder

Microfluidic glass chips with monolithically integrated Nanospray emitters for MS-coupling

1. Preis (Bester Vortrag), 17. Doktoranden-Seminar des Arbeitskreises "Separation Science" der Fachgruppe "Analytische Chemie" der GDCh, 7.-9. Januar **2007**, Hohenroda/Deutschland

Peter Hoffmann, Stefanie Fritzsche and Detlev Belder

Microchip Electrophoresis with MS-Detection in record speed

3. Preis (Posterpräsentation), ISC 2008 - 27th International Symposium on Chromatography 21.-25. September **2008**, Münster/Deutschland

Peter Hoffmann, Philipp Schulze and Detlev Belder

Microfluidic Glass Chips with Integrated Nanospray Emitters for MS-coupling

Posterpräsentation, ANAKON 2007, 27.-30. März **2007**, Jena/ Deutschland

1	Einleitung	8
1.1	ZIELSTELLUNG	10
2	Grundlagen	11
2.1	MIKROCHIPELEKTROPHORESE	11
2.1.1	<i>Elektrophorese und Elektroosmose</i>	<i>13</i>
2.1.2	<i>Aufbau und Durchführung</i>	<i>17</i>
2.1.3	<i>Detektion</i>	<i>20</i>
2.2	ELEKTROSPRAY-IONISATIONS-MASSENSPEKTROMETRIE.....	22
2.2.1	<i>Nanoelektrospray-Massenspektrometrie nach Wilm und Mann.....</i>	<i>26</i>
2.2.2	<i>Massenanalysatoren.....</i>	<i>29</i>
2.3	MIKROCHIP-MS-KOPPLUNGSTECHNIKEN	34
2.3.1	<i>Sprühen von Kante</i>	<i>34</i>
2.3.2	<i>Externer Emitter.....</i>	<i>35</i>
2.3.3	<i>Monolithisch integrierter Emitter</i>	<i>36</i>
2.3.4	<i>Elektrische Kontaktierung.....</i>	<i>38</i>
3	Experimenteller Teil	41
3.1	EMITTERFERTIGUNG	41
3.1.1	<i>Fräsen</i>	<i>42</i>
3.1.2	<i>Ziehapparatur</i>	<i>43</i>
3.1.3	<i>Ätzstation.....</i>	<i>44</i>
3.2	ARBEITSPLATZ	45
3.2.1	<i>MS-Interfaces.....</i>	<i>45</i>
3.2.2	<i>Massenspektrometer.....</i>	<i>46</i>
3.3	CHEMIKALIEN UND GERÄTE.....	47
3.3.1	<i>Geräte.....</i>	<i>48</i>
3.3.2	<i>Herstellung der Lösungen.....</i>	<i>49</i>
3.3.3	<i>Konditionierung der Mikrochips.....</i>	<i>49</i>
3.3.4	<i>Elektrische Kontaktierung.....</i>	<i>49</i>

4	Ergebnisse und Diskussion	50
4.1	HERSTELLUNG DES MONOLITHISCH INTEGRIERTEN EMITTERS.....	51
4.1.1	<i>Vermeidung von Totvolumen.....</i>	52
4.1.2	<i>Leitfähige Beschichtungen</i>	53
4.2	CHARAKTERISIERUNG VON NANOELEKTROSPRAY	54
4.2.1	<i>MS-Kompatibilität von Elektrolyten.....</i>	54
4.2.2	<i>Sprayperformance des monolithisch integrierten Emitters</i>	57
4.2.3	<i>Chip-MS Detektion.....</i>	62
4.3	MIKROCHIPELEKTROPHORESE - MASSENSPEKTROMETRIE.....	64
4.3.1	<i>Testgemische</i>	65
4.3.2	<i>Trennungsoptimierung</i>	67
4.3.3	<i>Systemstabilität</i>	76
4.3.4	<i>Serielles Layout.....</i>	78
4.3.5	<i>Make-Up Flow Layout</i>	84
4.4	ANWENDUNGEN	90
4.4.1	<i>Bestimmung der Flussrate.....</i>	90
4.4.2	<i>Tryptischer On-Chip Verdau von Rinderserumalbumin</i>	92
4.4.3	<i>Ultraschnelle Trennungen.....</i>	94
5	Zusammenfassung.....	98
6	Literaturverzeichnis	99

1 Einleitung

Die globale Verfügbarkeit von Mobiltelefonen, Laptops und Internet sowie der rasante technische Fortschritt in vielen anderen Bereichen unseres Lebens basiert entscheidend auf dem überwältigenden Erfolg der Miniaturisierung auf dem Gebiet der Mikroelektronik. Darunter versteht man die ständig wachsende Anzahl immer leistungsfähiger Funktionseinheiten, die auf immer kleinerem Raum integriert werden können.

Eine aktuelle und viel beachtete Forschungsrichtung in der Analytischen Chemie versucht diesen Trend auf etablierte Analysensysteme zu übertragen. Im Mittelpunkt steht die Implementierung und Automatisierung aller Verfahrensschritte des analytischen Prozesses: *Probennahme, Transport, Probenvorbereitung, Prozessierung (chemische Reaktionen), Stofftrennung* und *Detektion* innerhalb mikrofluidischen Strukturen auf einem miniaturisierten Gerät (Mikrochip). Hintergrund der Entwicklung war und ist die ständig steigende Nachfrage nach kontinuierlichen Verfahren zur Analyse chemischer Parameter als *Online-Analyse* mit dem Ziel, die Vorteile von chemischen Sensoren als chemisch/elektrische Signalwandler mit denen von Totalanalysensystemen mit breitem Methodenspektrum zu verbinden. Dazu formulierten A. Manz, N. Graber und H. M. Widmer¹ (Ciba-Geigy AG - Basel/Schweiz) 1990 ihren innovativen Ansatz von miniaturisierten chemischen Totalanalysensystemen (*μ -Total Chemical Analysis Systems*). Um die Auswirkungen der Miniaturisierung auf die Leistungsfähigkeit von Analysensystemen beurteilen zu können, schlugen die Wissenschaftler Skalierungsgesetze für die Kapillarelektrophorese, Flüssigchromatographie, und superkritische Flüssigkeits-Chromatographie vor, mit deren Hilfe sich nach Definition der Trenneffizienz, Analysenzeit und Joulesche Wärme numerische Werte für die Systemparameter Länge und Innendurchmesser der Trennkapillare ermitteln lassen. Außerdem resultiert aus der Miniaturisierung (*down scale*) chemischer Analysensysteme neben der drastischen Verringerung der Analysenzeit, vor allem die Verbesserung der Trenneffizienz. Dieser Effekt hat nach Meinung der Autoren sogar Priorität gegenüber der Reduzierung geometrischer Abmessungen, die der Verringerung von Proben- und Lösemittelvolumina entsprechen.

Wie aktuelle Übersichtsartikel^{2,3} zur *μ TAS*-Technik zeigen, steht die Integration analytischer Module für die Grundoperationen Transport, Probenvorbereitung, Reaktion/Prozessierung, Injektion und Trennung weiterhin im Mittelpunkt des Interesses. Solche *lab-on-a-chip* Systeme stellen insbesondere deshalb eine interessante Alternative zu bestehenden Analysensystemen dar, weil sie neben der Miniaturisierung auch die Parallelisierung chemischer Prozesse auf einem Mikrochip als Hochdurchsatzscreeningmethode ermöglichen⁴. Als Haupteinsatzgebiet aktueller und zukünftiger mikrofluidischer Applikationen gilt die Analyse einzelner und in ihrer Gesamtheit zu einem definierten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen als Proteom⁵

vorliegender Proteine. Dabei leitet sich die volle Funktionalität von Proteinen aus ihrer räumlichen Struktur und Halbwertszeit ab, die unabhängig vom genetischen Code über posttranslationale Modifikationen (PTM) festgelegt wird. Die ungeheure Vielzahl verschiedener Proteine in einem extrem weiten Konzentrationsbereich, bei hoher Oberflächenadsorption, verschiedenen Molekulargewichten und pI-Werten, Polaritäten und Löslichkeiten macht ein globales Analyseprotokoll jedoch unmöglich⁶. Auf der anderen Seite eröffnet in vielen Fällen erst das biochemische Verständnis über das komplexe Zusammenspiel der Proteine auf molekularer Ebene die Chance zur Behandlung komplizierter Krankheiten^{7,8}. Um nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms⁹ mit dem Eintritt in das Proteomics-Zeitalter¹⁰ den enormen Herausforderungen in der Bioanalytik gerecht werden zu können, bietet sich der Einsatz mikrofluidischer Systeme mit einer Vielzahl implementierbarer Prozessierungseinheiten an. Daneben sind auch auf dem Gebiet der klassischen Chemie im Hinblick auf die Synthese komplexer Moleküle im Rahmen der Naturstoffsynthese neue Analysemethoden gefragt, die einem hohen Probanddurchsatz in kurzer Zeit begegnen müssen¹¹.

Der gesteigerten Trennleistung, der hohen Analysengeschwindigkeit, dem äußerst geringen Reagenzienverbrauch und der Möglichkeit zur Systemintegration als entscheidende Vorteile miniaturisierter Analysensystemen stehen enorme Anforderungen bei der Detektion geringster Probenmengen gegenüber¹². Derzeit ist die Fluoreszenzdetektion auf Grund ihrer hohen Sensitivität und einfachen technischen Realisierung die dominierende Detektionsmethode für Chip-basierte Analysentechniken. Neben der Moleküldetektion, die noch ausführlich behandelt wird, findet sie in letzter Zeit immer häufiger Verwendung zur Analyse von Zellen^{13,14}.

Nach dem überwältigendem Erfolg der Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) zur Identifikation von Biomolekülen¹⁵ und der Möglichkeit zur Strukturaufklärung unbekannter Analyten wird dieser Technik auch zur Detektion innerhalb von μTAS -Systemen großes Potential eingeräumt¹⁶. Für den Erfolg dieses Ansatzes wird die Anpassung mikrofluidischer Flussraten im nL/min-Bereich an konventionelle Ionisationsquellen ($\mu L/min$) entscheidend sein. In diesem Zusammenhang stellt die Miniaturisierung der Massenanalysatoren im Hinblick eines vollständig integrierten *lab-on-a-chip* Ansatzes zusätzlich eine besondere Herausforderung dar^{17,18}.

1.1 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die totvolumenfreie Kopplung mikrofluidischer Systeme mit der Massenspektrometrie (MS). Die Ionisierung der Analyten soll mittels Nanoelektrospray (nanoES-MS) erfolgen. Diese Variante zeichnet sich bei äußerst geringen Flussraten gegenüber klassischer Elektrospray-Massenspektrometrie durch hohe Spraystabilität, verbesserte Ionisierungseffizienz und verringerte Ionensuppression aus.

Aufgrund seiner vorteilhaften Eigenschaften wie chemischer Resistenz, optischer Transparenz und mechanischer Stabilität wird Glas als Chipsubstrat favorisiert. Da bisher keine geeigneten Mikrofabrikationstechniken zur Herstellung monolithisch integrierter Emitter in Glas zur Verfügung stehen, ist die Entwicklung eines eigenen Herstellungsverfahrens notwendig. Danach ist die systematische Charakterisierung des Chip-Emitters im Vergleich zu konventionellen Nanospray-Nadeln unbedingt erforderlich. Außerdem soll die Anwendbarkeit der Detektionstechnik anhand einiger Standardsubstanzen nachgewiesen werden. Wichtigste Aufgabe dieser Arbeit ist die Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie. Sie setzt die Verfügbarkeit eines Chip-MS-Interfaces und geeignete Testgemische voraus. Zur Trennungsoptimierung sollen Messungen mittels Kapillarelektrophorese und Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie durchgeführt werden. Nach Demonstration der Machbarkeit (*Proof of Principle*) soll die Kopplung außerdem auf integrierte Chip-Systeme zur Durchführung chemischer Reaktionen mit anschließender Stofftrennung und Detektion übertragen werden.

2 Grundlagen

Am Anfang steht die Beschreibung der Mikrochipelektrophorese (MCE) als miniaturisierte Variante der weit verbreiteten Kapillarelektrophorese (CE). Danach wird ausführlich auf die Elektrosprayionisation (ESI) und die Nanoelektrospray-Massenspektrometrie (nanoES-MS) eingegangen um im dritten Teil den aktuellen Stand der Technik auf dem Gebiet der Mikrochip-MS-Kopplung zu erläutern.

2.1 Mikrochipelektrophorese

Der Fortschritt auf dem Gebiet der Mikrofabrikationstechniken (*Micro Electro Mechanical Systems*) hat in letzter Zeit zunehmende Bedeutung zur Miniaturisierung chemischer Analysetechniken erlangt. Am Anfang der Entwicklung wurden 1979 von Terry et al.¹⁹ gaschromatographische und 1990 von Manz et al.²⁰ flüssigchromatographische Trennungen in mikrofluidischen Kanälen durchgeführt, wobei die Photolithographie²¹ als etabliertes Fertigungsverfahren aus der Mikroelektronik angewendet wurde. Die Miniaturisierung der CE als MCE bietet neben dem Parallelisierungspotential und den geringen Elektrolyt- und Probenvolumina vor allem einen enormen Zuwachs an Analysegeschwindigkeit und ist deshalb für Anwendungen mit erhöhtem Probendurchsatz (*High Throughput Screening*) interessant.

1992 veröffentlichten A. Manz et al.²² ihre Ergebnisse zur ersten elektrophoretischen Trennung von Fluoreszenzfarbstoffen (Calcein und Fluorescein) in Mikrochips. Glas wird als Substrat zur Miniaturisierung in der Elektrophorese favorisiert, weil es sich gegenüber Silizium durch deutlich höhere Durchschlagspannungen auszeichnet und damit höhere Feldstärken ermöglicht. Nach der Demonstration der Machbarkeit (*Proof of Principle*) wurden bis heute vielfältige Applikationen mit der MCE realisiert^{23,24,25,26}. Konnten in der ersten chip-elektrophoretischen Trennung aufgrund limitierter Feldstärke von 200 V/cm, unzureichender Injektion und zu großer Detektionsvolumina nur Trennstufenzahlen von 18.000 erreicht werden bieten optimierte MCE-Trennungen mit 500 V/cm für Peptide und Proteine heute bereits Trennstufenzahlen bis 200.000, die sogar massenspektrometrische Detektion mit einschließen²⁷. Neben Glas als etabliertem aber teurem Chipsubstrat für die MCE ist seit einiger Zeit zudem eine wachsende Nachfrage an kostengünstigeren und leichter zu bearbeitenden Polymerwerkstoffen spürbar^{28,29}. Weit verbreitet und aktueller Forschungsschwerpunkt, auch in unserer Arbeitsgruppe, ist der Einsatz des biokompatiblen Polydimethylsiloxan (PDMS)^{30,31,32}, das sich hervorragend zur schnellen Prototypentwicklung von Mikrochips (*Rapid Prototyping*) eignet.

Für die Verbesserung der Trennleistung in der Kapillarelektrophorese werden seit langem verschiedene Substanzen zur Oberflächenmodifikation eingesetzt, die den elektroosmotischen Fluss kontrollieren und die Wandadsorption der Analyten verringern^{33,34}. Dabei unterscheidet man zwischen permanenten Beschichtungen (*Coatings*) als Modifikationen an der Kapillarwand und dynamischen Beschichtungen, bei der dem Trennpuffer unterschiedliche Stoffe zugesetzt werden. 1994 führten Gilges et al.³⁵ am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr die thermische Immobilisierung von Kapillaren mit Polyvinylalkohol (PVA) für hochauflösende Trennungen von Proteinen in der Kapillarelektrophorese ein, die auch für die massenspektrometrische Detektion geeignet ist³⁶. Eine Weiterentwicklung dieser Methode stellt die Quervernetzung zwischen den Silanolgruppen der Kapillarwand und den Hydroxygruppen des PVA mit Glutaraldehyd dar, die eine exzellente Langzeitstabilität über 1000 CE-Trennungen ohne den Verlust an Trennleistung gewährleistet³⁷.

Analog zur CE besteht auch in der MCE ein großer Bedarf an effektiven *Coatings* zur Verbesserung der Trennleistung. Die positiven Erfahrungen mit PVA aus der CE konnten bereits erfolgreich auf die MCE übertragen werden³⁸. Außerdem verbessert der Einsatz dieses neutralen Polymers die Trennleistung alternativ durch Mikro-Sandstrahlen (*Powder Blasting*) hergestellter mikrofluidischer Glaschips drastisch³⁹ und steigert die Effizienz chiraler Trennungen⁴⁰. Zur Steigerung der Trenneffizienz durch Coating der Mikrofluidikkanäle werden neben PVA weitere Polymere eingesetzt. Den Stand der Technik zur Oberflächenmodifikation in der MCE geben drei Übersichtsartikel wieder^{41,42,43}. Neben klassischen Anwendungen zur Untersuchung von Biomolekülen kann die MCE durch Zugabe von Cyclodextrinen als chirale Selektoren im Trennpuffer auch zur Analyse von Enantiomeren eingesetzt werden⁴⁴. Aufgrund der höheren Analysengeschwindigkeit und dem höherem Probandendurchsatz ist die MCE gegenüber der CE vor allem für die pharmazeutische Industrie interessant, denn spätestens seit dem Contergan[®]-Skandal (Wirkstoff Thalidomid) müssen Arzneimittelhersteller die Enantiomerenreinheit ihrer Produkte nachweisen. Das große Potential der MCE für schnelle Enantiomerentrennungen innerhalb einer Minute⁴⁵ und sogar binnen einer Sekunde⁴⁶ wurde bereits eindrucksvoll aufgezeigt. Auf dem Weg zu vollständigen Chiplaboratorien ist die Integration einer enantioselektiven Katalyse mit chiraler Elektrophorese zur Analyse der Reaktionsprodukte ein wichtiger Meilenstein⁴⁷.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Mikrochipelektrophorese bereits einen hohen Entwicklungsstand erreicht hat, die Systemintegration von Reaktion und Analyse auf einem Chip jedoch erst am Anfang steht und eine viel größere Herausforderung darstellt.

2.1.1 Elektrophorese und Elektroosmose

Zum Verständnis von Elektrophorese und Elektroosmose als Stofftransportmechanismen in der Kapillarelektrophorese (CE) und Mikrochipelektrophorese (MCE) ist die Kenntnis über Wechselwirkungen von Ionen in Elektrolytlösungen (*Debye-Hückel-Theorie*) und über ihr Verhalten an Grenzflächen (*Stern-Model der elektrischen Doppelschicht*) notwendig.

Nach Anlegen einer elektrischen Gleichspannung wirken auf das Ion die beschleunigende elektrische Kraft F_{Elek} und die bremsende Reibungskraft F_{R} (*Stokes'sche Reibung*). Voraussetzung für die Trennung der Ionen sind ihre unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten, die sich nach Gl. 1 aus den stoffspezifischen elektrophoretischen Mobilitäten und der elektrischen Feldstärke ermitteln lassen.

Gl. 1	$F_{\text{Elek}} = F_{\text{R}}$	F_{Elek} - elektrische Feldkraft [N] F_{R} - Reibungskraft [N]
	$zeE = -6\pi\eta r v_{\text{EP}}$	z - Ladung e - Elementarladung = $1,6 \times 10^{-19}$ C
	$v_{\text{EP}} = -\frac{zeE}{6\pi\eta r}$	E - elektrische Feldstärke [V/m] η - dynamische Viskosität [Pas] r - Teilchenradius [m]
	$v_{\text{EP}} = \mu_{\text{EP}} E$	v_{EP} - elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [m/s] μ_{EP} - elektrophoretische Mobilität [m^2/Vs]

Zwar stellt die Gleichung eine einfache Möglichkeit zur Berechnung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit dar, zur genaueren Betrachtung muss das Modell jedoch erweitert werden. Aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen und Lösemittelmolekülen kommt es zur Ausbildung von Solvathüllen. Deren Größe hängt vom polaren Charakter des Lösemittels (Dipolmoment) und der Raumladungsdichte des Zentralions ab. Bei Nachbarschaft im Periodensystem sind Kationen im Vergleich zu Anionen kleiner. Daraus resultieren größere Raumladungsdichten, so dass sich mehr Lösemittelmoleküle um das Zentralion anlagern. Die Solvationszahl gibt die Anzahl der Lösemittelmoleküle als Summe in der inneren und äußeren Hülle ($n_{\text{Solvat}} = n_{\text{prim}} + n_{\text{sek}}$) an⁴⁸. Die Abweichung realer flüssiger Phasen vom Idealverhalten aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen steht im Mittelpunkt der Debye-Hückel-Theorie. Mittels Aktivitätskoeffizienten γ_i als Funktion von Ionenstärke, Temperatur und Dielektrizitätskonstante des Lösemittels ist die Berechnung der Aktivität (a_i) aus der Stoffmengenkonzentration (c_i) über $a_i = \gamma_i \times c_i$ und damit die Bestimmung elektrochemischer

Gleichgewichte über die Nernst-Gleichung möglich. Abb. 1 steht zur Verdeutlichung der Zusammenhänge von Elektrophorese und Elektroosmose in der CE/MCE. Durch Ausbildung der Solvathülle kommt es zur Abschirmung des Zentralions, was einer Verringerung seiner effektiven Ladung und damit der Verlangsamung im elektrischen Feld entspricht (*Retardationseffekt*). Daneben wirkt eine zweite bremsende Kraft, die nach Anlegen des elektrischen Feldes die Trennung der Ladungszentren von Ion und Solvathülle verursacht. (*Relaxationseffekt*)

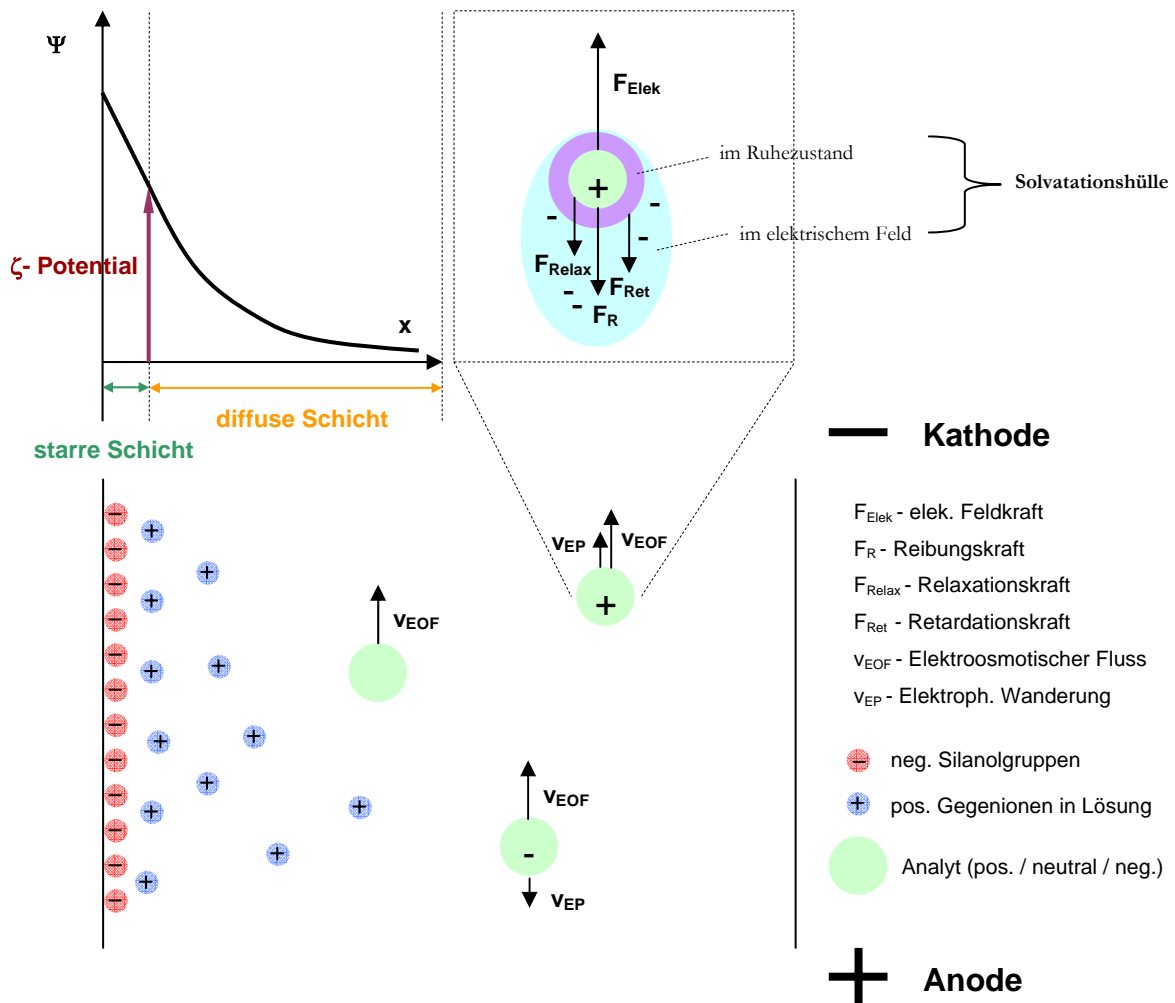


Abb. 1 Potentialverlauf an elektrischer Doppelschicht (Stern-Modell), auf Analyt in Lösung einwirkende Kräfte und Überlagerung von elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit und elektroosmotischem Fluss (siehe Text)

Den unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten zur Trennung der Analyten ist der Elektroosmotische Fluss (EOF) als systemabhängige Elektrolytbewegung überlagert. Ursache seiner Entstehung sind nach der Theorie von Stern die unterschiedlichen Ladungsverhältnisse an der Phasengrenzfläche zwischen Kapillarmwand und Lösung. Die Oberfläche von Glaskapillaren (Quarz/Borofloat) besteht aus Silanolgruppen, die ab einem pH-Wert > 2 zunehmend als SiO^- deprotoniert vorliegen und somit das Oberflächenpotential Ψ ausbilden (Abb.). Aufgrund

elektrostatischer Anziehungskräfte kommt es zur Anlagerung positiver Gegenionen des Elektrolyten als starre Schicht (*Helmholtz oder Stern-Schicht*) direkt an der Kapillarwand. In der Folge nimmt das Oberflächenpotential in dieser Schicht von außen nach innen linear ab. Hinter der starren Schicht lagern sich in größerem Abstand weitere Gegenionen mit thermischer Eigenbewegung als diffuse Schicht (*Gouy-Chapman-Schicht*) an, infolgedessen das Potential exponentiell abnimmt. Die Ausdehnung der diffusen Schicht in die Pufferlösung zur Kapillarmitte wird als Debye-Länge bezeichnet. Nach Gl. 2 ist sie umgekehrt proportional zur Ionenstärke. Geringe Ionenstärken ziehen große Debye-Längen nach sich. In Lösungen mit hohen Ionenstärken wird die Kapillaroberfläche dagegen stark abgeschirmt, woraus schmale diffuse Schichten resultieren. Für 100 mM Borat-Lösung wird als Schichtdicke 1 nm angegeben⁴⁹.

Gl. 2

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon k_B T}{2 N_A e^2 I}}$$

λ_D - Debye-Länge (Schichtdicke)

ε - Dielektrizitätskonstante [As/Vm]

k_B - Boltzmann-Konstante = $1,38 \times 10^{-23}$ J/K = R / N_A

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon R T}{2 F^2 I}}$$

R - universelle Gaskonstante = 8,3 J/mol*K

T - Temperatur [K]

N_A - Avogadro-Konstante = $6,022 \times 10^{23}$ /mol

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

e - Elementarladung = $1,6 \times 10^{-19}$ C = F / N_A

F - Faraday-Konstante = 96485 C/mol

I - Ionenstärke / c - Konzentration / z- Ladung

Das Potential an der Scherebene zwischen starrer und diffuser Schicht wird als Zeta-Potential ζ bezeichnet (Abb. 1). Messtechnisch ist diese Größe an makroskopischen Oberflächen in Flüssigkeiten über die Bestimmung des Strömungspotentials erfassbar⁵⁰. Nach der HELMHOLTZ-SMOLUCHOWSKI-Gleichung (Gl. 3) ist das Zeta-Potential direkt proportional zum Elektroosmotischen Fluss (EOF), der nach Anlegen eines elektrischen Feldes durch Impulsübertragung auf die Lösemittelmoleküle entsteht und bei den beschriebenen Oberflächeneigenschaften längs zur Kapillare in Richtung Kathode wirkt.

Gl. 3

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \varepsilon}{4 \pi \eta}$$

ζ - Zeta-Potential

ε - Dielektrizitätskonstante [As/Vm]

η - dynamische Viskosität [Pas]

E - elektrische Feldstärke [V/m]

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E$$

μ_{EOF} - elektroosmotische Mobilität [m²/Vs]

v_{EOF} - elektroosmotische Wanderungsgeschw. (EOF) [m/s]

Gegenüber druckgetriebenen Trenntechniken mit parabolischem Strömungsprofil zeichnet sich der EOF durch sein flaches Strömungsprofil aus und ist damit hauptverantwortlich für die hohen Trennstufenzahlen in der CE. Aufgrund der großen Abhängigkeit des Zeta-Potentials von chemischen Systemparametern (pH-Wert, Dielektrizitätskonstante und Ionenstärke) ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur Beeinflussung des EOF (S. - 3.3.2 Trennungsoptimierung).

Analytische Kenngrößen

Zur qualitativen Beschreibung elektrophoretischer Trennungen werden in Analogie zur Chromatographie, nach Empfehlung der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), die analytischen Kenngrößen *Selektivität*, *Trennstufenzahl* und *Auflösung* verwendet⁵¹.

Tab. 1 Analytische Kenngrößen in der Mikrochipelektrophorese

Kenngröße	Formelzeichen/Gleichung	Beschreibung
<i>Selektivität</i>	$\alpha = \frac{\mu_{ep_A}}{\mu_{ep_B}}$	Grundlage der elektrophoretischen Trennung $\mu_{ep_A} > \mu_{ep_B}$ μ_{ep_A} - elektrophoretische Mobilität Analyt A μ_{ep_B} - elektrophoretische Mobilität Analyt B
<i>Trennstufenzahl</i> (<i>Trenneffizienz</i>)	$N = \left(\frac{t}{\sigma}\right)^2$ $N = 16 \left(\frac{t}{w}\right)^2$ $N = 5,54 \left(\frac{t}{w_h}\right)^2$	Bestimmung der Trenneffizienz $w = 4\sigma$ $w_h = 2,354\sigma$ t - Migrationszeit w - Basispeakbreite w _h - Halbwertsbreite
<i>Auflösung</i>	$R = 2 \frac{t_B - t_A}{w_B + w_A}$ $R = 1,18 \frac{t_B - t_A}{w_{h_B} + w_{h_A}}$ <p>Verknüpfung von Trenneffizienz und Selektivität nach Giddings⁵²</p> $R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\Delta U}{U}$	Basislinientrennung bei $R \geq 1,5$ t _A - Migrationszeit Analyt A t _B - Migrationszeit Analyt B w _A - Basispeakbreite Analyt A w _B - Basispeakbreite Analyt B w _{h_A} - Halbwertsbreite Analyt A w _{h_B} - Halbwertsbreite Analyt B $\frac{\Delta U}{U}$ - relative Geschwindigkeitsdifferenz der Analyten A und B (<i>relative velocity difference</i>)

2.1.2 Aufbau und Durchführung

Abb. 2 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Mikrochips für die Elektrophorese. Die Grundplatte beinhaltet die photolithographisch hergestellte, mikrofluidische Kanalstruktur. Das dargestellte klassische Kreuzlayout aus Injektions- und Trennkanal dient der Probenaufgabe (Injektion). Alternativ können T- und Doppel-T-Strukturen eingesetzt werden. Über Zugangsöffnungen (*vials*) in der Deckplatte werden die zur Durchführung der MCE notwendigen elektrischen Spannungen angelegt und die Kanalstruktur mit Elektrolyt und Probe befüllt. Man unterscheidet zwischen Puffereinlass (*Buffer Inlet*), Pufferauslass (*Buffer Inlet*), Probeneinlass (*Sample Inlet*) und Probenauslass (*Sample Outlet*). Grundplatte und Deckplatte sind fest miteinander verbunden.

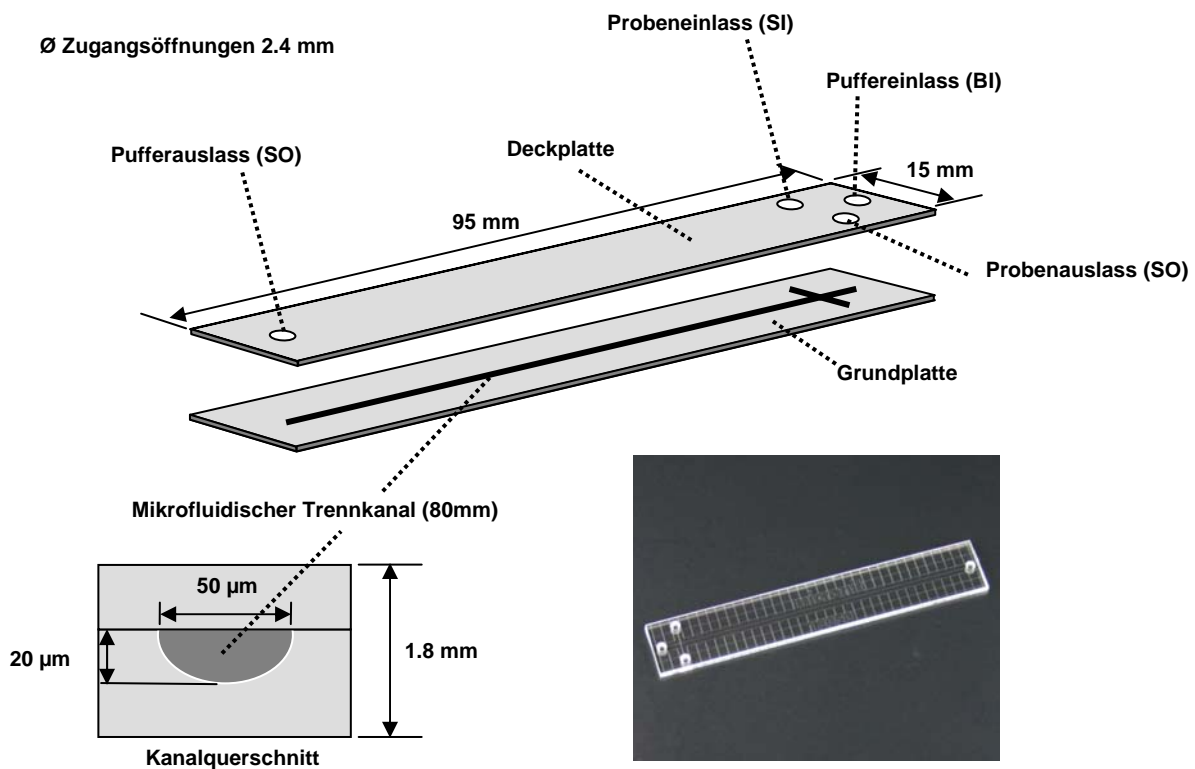


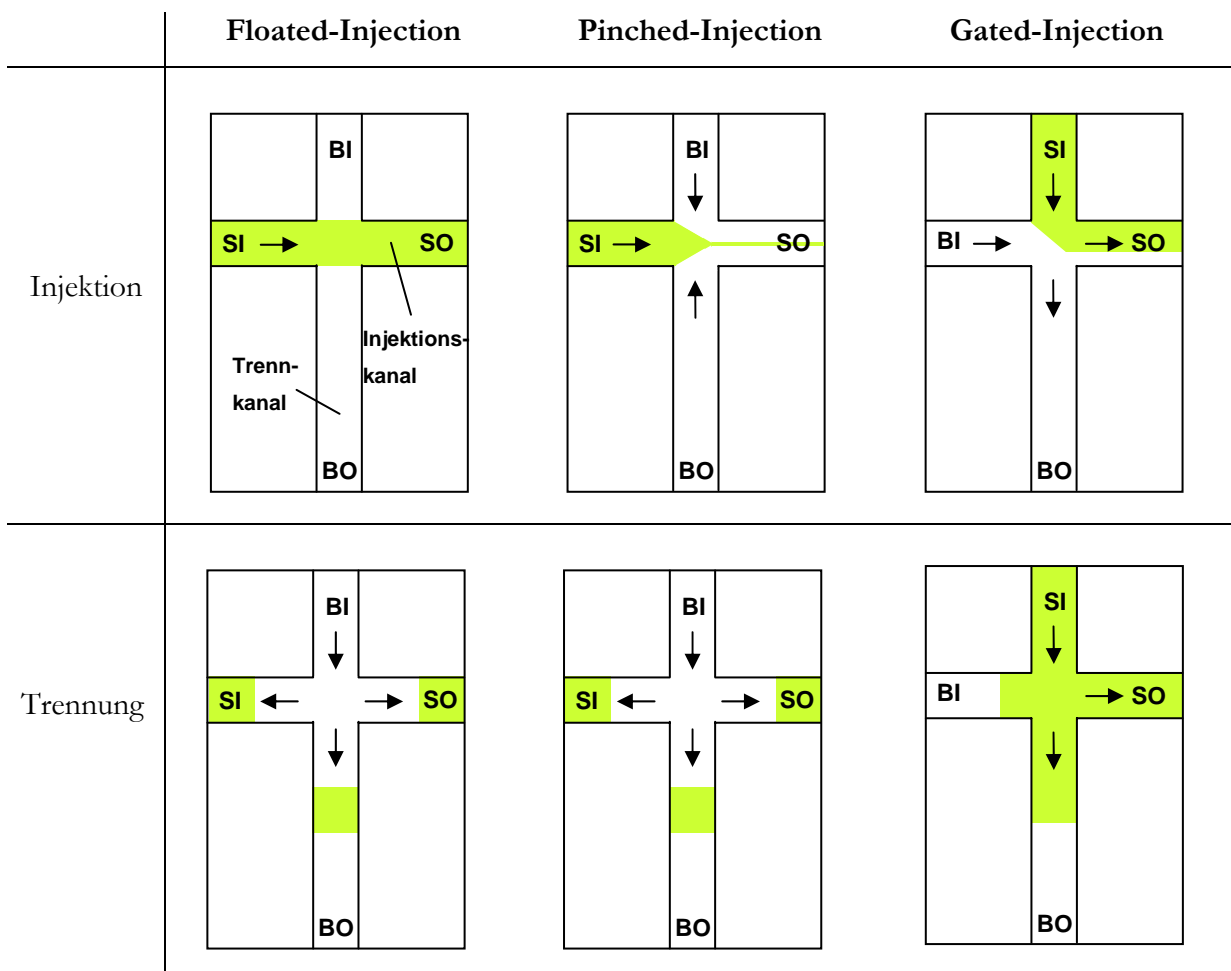
Abb. 2 Deck-, Grundplatte und Abmessungen eines Elektrophorese-Mikrochips sowie der Querschnitt des mikrofluidischen Trennkanals und kommerzielles Produkt aus Glas (Micronit Microfluidics BV/Niederlande)

Zurzeit haben Trennstrecken kommerzieller Mikrochips eine maximale Länge von 80 mm^{53,54}. Unter Beibehaltung der Chip-Abmessungen sind Serpentin-Layouts zur Steigerung der Trenneffizienz vielversprechend. Problematisch ist dabei jedoch die Bandenverbreiterung in den Kanalwindungen, die zur Verschlechterung der Trenneffizienz führt. Als Lösungsansatz wird die Verringerung des Kanalinnendurchmessers in den Kurven vorgeschlagen^{55,56}.

Probenaufgabe (Injektion)

In der Mikrochipelektrophorese findet die Probenaufgabe in den meisten Fällen elektrokinetisch als *Floated*, *Pinched* oder *Gated* Injektion statt⁵⁷. Im Idealfall erfolgt die Steuerung während Injektion und Trennung mittels umschaltbarer 4-Kanal Hochspannungsquellen durch angelegte Spannungen, die separat an jeder Zugangsöffnung des Mikrochips appliziert werden können. Tab. 2 fasst die unterschiedlichen Injektionsarten zusammen. Bei der *Floated*-Injektion liegt am BI- und BO-Vial keine Spannung an, so dass Probendiffusion in den Trennkanal möglich ist. Die Verbreiterung der Probenzone führt zur Verschlechterung der Trenneffizienz. Dagegen findet bei der *Pinched*-Injektion (Pinzetteninjektion) durch Anlegen von Spannungen im BI- und BO-Vial, zu erkennen als Vektorpfeile, Probenfokussierung im Injektionskreuz statt. Die Probenaufgabe bei der *Gated*-Injektion ist erst mit erneuter Injektion durch Gegenströmung des Elektrolyten abgeschlossen und ermöglicht Mehrfachinjektionen. Diese Injektionsvariante eignet sich deshalb hervorragend zur Analyse von Reaktionskinetiken.

Tab. 2 Prinzip der elektrokinetischen Injektionsarten in der Mikrochipelektrophorese: *Floated*-, *Pinched*- und *Gated*-Injektion (hellgrün: Probenzone)



Analog zur Kapillarelektrophorese existieren auch in der Mikrochipelektrophorese verschiedene Varianten der elektrophoretischen Trennung der Analyten, die hier kurz vorgestellt werden.

Unter **Kapillarzonenelektrophorese (CZE)**, häufig auch einfach als Kapillarelektrophorese (CE) bezeichnet, versteht man die Trennung geladener Teilchen aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten (Mobilitäten) im elektrischen Feld. Als Mikrochipelektrophorese (MCE) handelt es sich um die am weitesten verbreitete Trennmethode in mikrofluidischen Systemen, die im Rahmen dieser Arbeit theoretisch behandelt und praktisch angewendet wurde. Eine andere Variante der klassischen CZE ist die **Kapillargelelektrophorese (CGE)**, bei der sich die Trennwirkung aus unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten und dem Siebeffekt des Polyacrylamidgels (Molekülgröße) ergibt. In Mikrochips wird die Methode gern zur Trennung von Proteinen eingesetzt^{58,59}. Die **Kapillarelektrochromatographie (CEC)** vereint Vorteile der Chromatographie und Kapillarelektrophorese. Neben unterschiedlichen Mobilitäten steigern Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase die Selektivität, während das flache Strömungsprofil des EOF hohe Trenneffizienzen ermöglicht⁶⁰. Aufgrund der guten Handhabbarkeit und Funktionalität mittels Photopolymerisation bieten sich vor allem Monolithen als Trennmedien in Mikrofluidikkanälen an⁶¹. Zur Trennung nichtionischer Verbindungen wurde die **Mizellare Elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)** von der CE auf Mikrochips übertragen⁶². Dabei basiert der Trennmechanismus auf dem Verteilungsgleichgewicht des Analyten zwischen Puffer und amphiphilen Detergenzien, die oberhalb einer bestimmten Konzentration (**Critical Micelle Concentration**) Mizellen ausbilden. In wässrigen Lösungen lagern sich hydrophile Molekülteile nach außen, hydrophobe Molekülteile nach innen. Dadurch entsteht eine, sich mit dem EOF bewegende, „stationäre Phase“ mit welcher der Analyt wechselwirkt. Häufig eingesetzte Detergenzien sind Natriumdodecylsulfat⁶³ (**Sodium Dodecyl Sulfate**) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)⁶⁴. Die Möglichkeit zwitterionische Analyten zu untersuchen, eröffnet der Einsatz der **Kapillarisoelektrischen Fokussierung (CIEF)**. Damit können Probenkomponenten auch in miniaturisierten Systemen entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) im pH-Gradienten aufgetrennt werden⁶⁵. Vor dem Hintergrund beschränkter Peakkapazitäten bieten **zweidimensionale Techniken** die Chance zur Verbesserung der Trennleistung in mikrofluidischen Systemen. Wegweisende Arbeiten auf diesem Gebiet, mit Peakkapazitäten bis 4200, stammen aus der Arbeitsgruppe des *lab-on-a-chip* Pioniers J. M. Ramsey (CEC-CE/MEKC-CE)^{66,67,68}. Problematisch ist jedoch die stufenweise Elution aus der 1. in die 2. Dimension, die eine Begrenzung der Trennstrecke in der 2. Dimension und durch Fraktionierung der Probe einen Sensitivitätsverlust nach sich zieht¹⁶.

2.1.3 Detektion

Durch die geringen Probenvolumina im nL-Bereich, bei hohen Analysengeschwindigkeiten, resultiert für die MCE eine große Nachfrage an sensitiven und schnellen Detektionstechniken. Im Vergleich zur klassischen Kapillarelektrophorese (CE) hat die UV-Detektion in der Mikrochipelektrophorese (MCE) nur geringe Bedeutung erlangt, weil sich aufgrund der limitierten optischen Weglänge im Mikrofluidikkanal nur geringe Nachweisgrenzen ergeben⁶⁹. Gegen diese Technik spricht auch der hohe Preis für UV transparente Mikrochips aus Quarzglas. Deshalb wurden alternative Methoden von der CE auf die MCE übertragen und miniaturisiert.

Fluoreszenz

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit, bis hin zur Detektion von einzelnen Molekülen^{70,71} (*Single Molecule Detection*), ist die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) zurzeit die Methode der Wahl zur Detektion in mikrofluidischen Systemen^{72,73}. Zur Anregung im sichtbaren Spektralbereich werden sehr oft Argon-Ionen Laser^{74,75,76} (488nm) eingesetzt. McClain et al.⁷⁷ integrierten zum Screening von *Jurkat* Zellen (humane T-Zelllinie eines Leukämiepatienten)⁷⁸ verschiedene Einheiten für Handling, Zellyse und Elektrophorese. LIF findet dabei Verwendung zum Nachweis der aus den Zellen freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffe Oregon Green, Carboxyfluorescein, Calcein AM und ihrer Metaboliten. Eigenbausysteme in der Forschung zeichnen sich in der Regel durch hohe Flexibilität aus. Daneben wird die LIF-Detektion auch in kommerziellen Chip-Systemen zur Routineanalyse von RNA, DNA, Proteinen und Zellen eingesetzt^{79,80,81}. Alternative Systeme zur Fluoreszenzanregung sind lampenbasiert^{82,83,84} oder enthalten lichtemittierende Dioden^{85,86} (LED), die sich vor allem durch ihren geringen Preis und die Flexibilität bei der Wahl der Wellenlänge auszeichnen. Allen diesen Methoden ist die Fluoreszenzdetektion im sichtbaren Spektralbereich gemeinsam, die enorme Vorteile bietet und die hohe Nachweisempfindlichkeit der Methode begründet. Die Fluoreszenzfarbstoffe haben hier ihre maximale Quantenausbeute, die Detektoren (*Photo Multiplier Tube* und *Charge Coupled Device*) arbeiten mit der höchsten Empfindlichkeit und preiswertere UV intransparente Materialien können verwendet werden⁸⁷. Nachteilig ist jedoch die notwendige Derivatisierung als zusätzlicher Schritt in der Probenvorbereitung, die abhängig von funktionellen Gruppen zu komplexen Stoffgemischen führen kann und bei geringen Analyt-Konzentrationen oft problematisch verläuft. Eine Alternative stellt die intrinsische (native) Fluoreszenzdetektion von aromatischen Systemen durch Ein-Photonenanregung im tiefen UV bei 266nm^{88,89,90} oder durch Multi-Photonenanregung⁹¹ dar. Aktuelle Entwicklungen auf diesem Gebiet fasst der Übersichtsartikel von P. Schulze⁹² zusammen.

Amperometrie

Amperometrie ist die am meisten publizierte elektrochemische Detektionstechnik in der MCE⁹³. Sie setzt elektroaktive Analyten voraus, die bei konstanter Spannung zur Referenzelektrode an der Arbeitselektrode oxidiert oder reduziert werden. Der resultierende Messstrom ist direkt proportional zur Analytkonzentration. Größte Herausforderung ist das Entkoppeln des elektrochemischen Detektors vom Feld der elektrophoretischen Trennung. Analog zur Entwicklung in der CE mit den Elektrodenkonfigurationen *off-column/end-column* wurden für die MCE *off-channel/end-channel* eingeführt. In der Mehrzahl der veröffentlichten Arbeiten findet die *end-channel* Variante Verwendung, bei der alle Elektroden zusammen (Arbeits-, Referenz-, und Erdungselektrode für Elektrophorese) im Reservoir am Kanalausgang positioniert und über einen Potentiostaten geregelt werden. Der Elektrodenabstand hat dabei großen Einfluss auf das Detektorverhalten und muss für reproduzierbare Messungen immer gleich sein^{94,95}. Deshalb ist die Implementierung der Elektroden als Leiterplatinen während des Herstellungsprozesses sinnvoll^{96,97,98} und ermöglicht portable Handgeräte⁹⁹. In der Vergangenheit konnten bereits viele Verbindungen, z.B. Chlorphenole, Katecholamine, derivatisierte AS und Sprengstoffe (DNB, DNT, TNT) amperometrisch analysiert werden¹⁰⁰. Schon in der Erstveröffentlichung zur amperometrischen Detektion in der MCE von Mathies et al. wurden durch indirekte Detektion DNA Restriktionsfragmente und PCR Produkte der Analyse zugänglich gemacht¹⁰¹.

Konduktometrie

Messprinzip dieser Methode, mit angelegter Wechselspannung, ist die unterschiedliche elektrische Leitfähigkeit der Analyten im Vergleich zum eingesetzten Elektrolyten. In der Praxis werden zwei Elektrodenanordnungen unterschieden: 1. Messung mit direktem Kontakt der Elektroden (*contact*) und 2. die kapazitative Kopplung (*contactless*)¹⁰². Aufgrund der großen Vorteile gegenüber der *contact*-Anordnung (geringeres Hintergrundsignal, keine Bläschenbildung durch Elektrolyse und bessere Integration der Elektroden) setzt sich die *contactless*-Variante in der MCE langsam durch¹⁰³.

Im Vergleich zur Amperometrie ist die Konduktometrie die flexiblere elektrochemische Methode, da auch nicht elektroaktive Substanzen und über indirekte Detektion AS, Peptide, Proteine und Oligonuklotide¹⁰⁴ detektiert werden können.

Neben den etablierten Techniken Fluoreszenz, Amperometrie und Konduktometrie spielt die Nanoelektrospray-Massenspektrometrie mit der Möglichkeit zur Strukturaufklärung der Analyten durch extrahierte Massenspektren eine immer größere Rolle zur Detektion in der Mikrochipelektrophorese. Sie ist die in dieser Arbeit verwendete Detektionstechnik und wird deshalb im Folgenden detailliert beschrieben.

2.2 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die Einführung von MALDI¹⁰⁵ (*Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionization*) und ESI¹⁰⁶ (*Electrospray Ionization*) als weiche Ionisationsarten hat die massenspektrometrische Detektion von Biomolekülen revolutioniert^{107,108,109}. Zur Ionisation unpolarerer, thermisch stabiler Verbindungen bei Atmosphärendruck (*Atmospheric Pressure Ionization*) empfiehlt sich außerdem der Einsatz von APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) oder APPI (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*).

Bei MALDI-MS findet die Ionisation aus einer kristallinen Matrix mittels Laser-Impuls statt, die im Allgemeinen zur *Offline*-Analyse eingesetzt wird. Dahingegen kann bei ESI direkt aus der Lösung detektiert werden, was die Kopplung mit chromatographischen und elektrophoretischen Trenntechniken erlaubt und somit die Analyse komplexer Stoffgemische ermöglicht^{110,111}. Die Reihenschaltung zweier oder mehrerer Massenanalytoren erlaubt MS/MS (Tandem) und MSⁿ-Experimente und liefert zusätzliche Strukturinformationen^{112,113,114}.

Unter Elektrospray versteht man das Versprühen einer Flüssigkeit unter Einwirkung eines elektrischen Feldes. Dieses Phänomen wurde von J. Zeleny bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wissenschaftlich untersucht^{115,116}. In den 70er Jahren erzeugten M. Dole et al. mit Hilfe von Elektrospray gasförmige Ionen von Polystyrol, konnten diese in Ermangelung geeigneter Analytoren jedoch nicht direkt massenspektrometrisch nachweisen¹¹⁷. Mit der Verfügbarkeit von Quadrupol-Massenspektrometer widmeten sich zeitgleich die Arbeitsgruppen von J. Fenn^{118,119} (Yale/USA) und M. Aleksandrov¹²⁰ (Leningrad/UdSSR) diesem Forschungsthema und etablierten damit die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS). 2002 wurden die Arbeiten von J. Fenn (ESI), K. Tanaka (MALDI) und K. Wüthrich (NMR) zur Analyse biologischer Makromoleküle mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet.

Während der Elektrosprayionisation findet im Gegensatz zu APCI/APPI keine Ionisierung der Analytmoleküle in der Gasphase statt. Vielmehr werden die bereits in Lösung vorliegenden Kationen/Anionen in die Gasphase überführt und somit für die MS-Detektion zugänglich¹²¹. Außerdem können ungeladene Analytmoleküle mit Ionen aus der Lösung assoziieren, wie es beispielsweise bei Natrium-Addukten von Zuckern beobachtet wird, die als detektierbare Gasphasenionen in das Hochvakuum des Massenanalytators transferiert werden.

Durch Anlegen des elektrischen Feldes kommt es zur Ladungstrennung an der Kapillarspitze. Kationen sammeln sich an der Flüssigkeitsoberfläche an und werden von der Gegenelektrode (MS-Eingang) angezogen. Während die Oberflächenspannung der Flüssigkeit dem entgegenwirkt, kommt es im Gleichgewicht zwischen elektrostatischer Kraft und Oberflächenspannung zur quasikonischen Deformation an der Grenzfläche Flüssigkeit/Luft¹²².

Erreicht das elektrische Feld den Schwellwert E_{on} (*electrospray onset*)¹²³ beginnt die Ausbildung des charakteristischen Taylor-Konus¹²⁴ (Gl. 4). Im stabilen Zustand (*cone-jet mode*) werden über das Flüssigkeitsfilament (*jet*) geladene Flüssigkeitströpfchen als Spray (*plume*) emittiert (Abb. 3).

Gl. 4

$$E_{on} = \sqrt{\left(\frac{2\gamma \cdot \cos \theta_0}{\epsilon_0 \cdot r_c} \right)}$$

γ - Oberflächenspannung der Lösung	[N/m]
θ_0 - Öffnungswinkel 49,3°	
ϵ_0 - Dielektrizitätskonstante im Vakuum	[As/Vm]
r_c - Außenradius der Kapillarspitze	[m]

Die Zugabe der organischen Modifier Methanol ($\gamma = 22,3$ mN/m), Acetonitril ($\gamma = 28,3$ mN/m) oder Isopropanol ($\gamma = 21,2$ mN/m) ermöglicht durch Verringerung der Oberflächenspannung im Vergleich zu Wasser ($\gamma = 71,8$ mN/m)¹ das Versprühen der Lösungen bei geringeren Feldstärken. Vor allem im Negativmodus (negatives Potential an der Kapillarspitze) können durch hohe Feldstärken schnell unerwünschte elektrische Entladungen (*corona discharges*) auftreten¹²⁵.

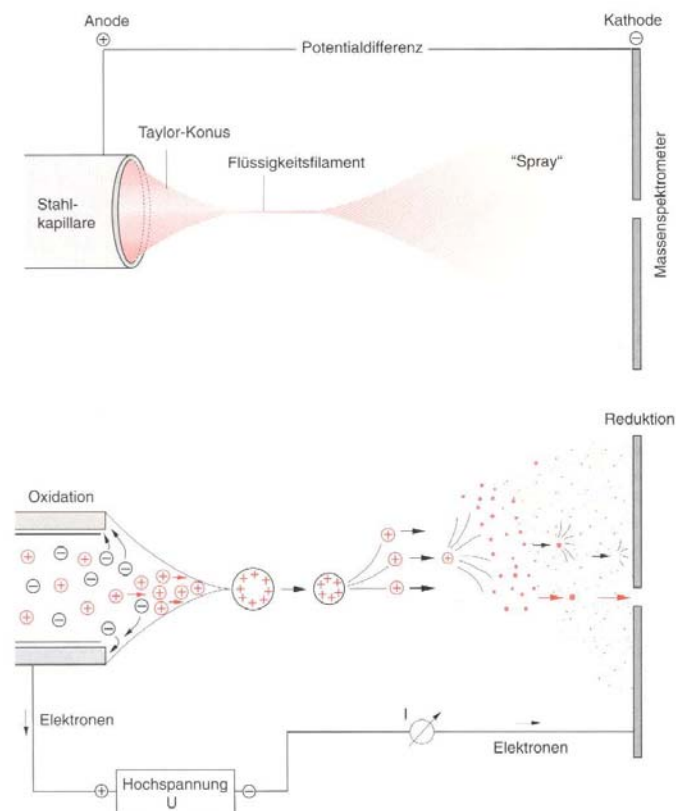


Abb. 3 Schematische Darstellung des makroskopischen (oben) und mikroskopischen (unten) ESI-Prozesses aus F. Lottspeich / H. Zorbas „Bioanalytik“¹²⁶ (Beschreibung im Text)

¹ Stoffdaten bei 25 °C (nach Y. Marcus “The Properties of Solvents” Wiley 1998)

Die Zufuhr thermischer Energie im MS-Interface als N₂-Strom (*curtain gas*) oder über eine Transferline (beheizte Metallkapillare) bewirkt das Verdampfen von Lösemittel, die geladenen Anfangströpfchen schrumpfen. Bei konstanter Ladung Q steigt die Oberflächenladungsdichte der Tröpfchen bis zur Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit)¹²⁷. Während der Coulomb-Explosion überschreitet die abstoßende Coulombkraft gleicher Ladungen die Oberflächenspannung der Flüssigkeit (Gl. 5) und es kommt zum Zerfall in viele kleinere Tröpfchen (*fission*).

Gl. 5
$$Q = 8\pi \cdot \sqrt{\epsilon_0 \cdot \gamma \cdot R^3}$$

γ - Oberflächenspannung der Lösung
 ϵ_0 - Dielektrizitätskonstante im Vakuum
R - Tröpfchenradius

Da das Verdampfen des Lösemittels fortwährend stattfindet, können auch mehrere Coulomb-Explosionen hintereinander ablaufen. Kebarle et al.¹²⁸ entwickelten folgendes Zerfallschema (Abb. 4), bei dem die neuen Tröpfchen (*offspring droplets*) im Vergleich zu den Elterntöpfchen (*parent droplets*) einen 90% geringeren Radius aufweisen. Gomez et al.¹²⁹ beobachten den Tröpfchenzerfall schon bei 80% des Rayleigh-Limits (*uneven fission*).

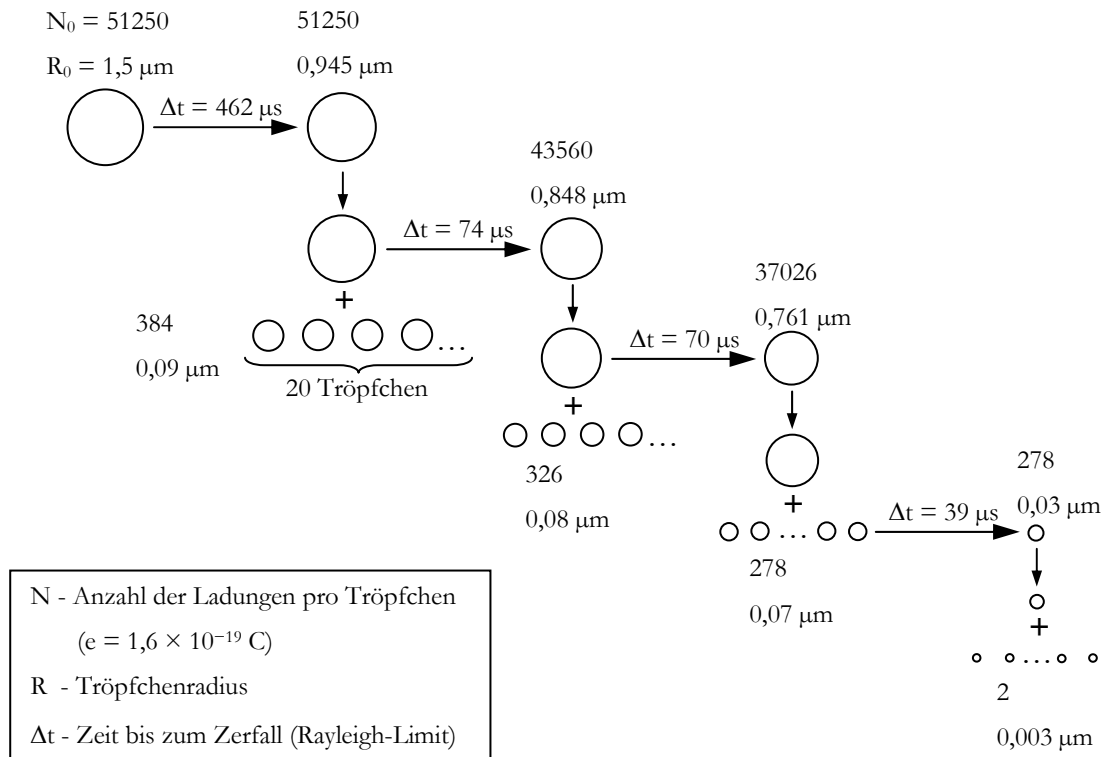


Abb. 4 Zerfallsschema von geladenen Flüssigkeitströpfchen mit Erreichen des Rayleigh-Limits¹²⁸

Über die Frage, wie aus geladenen Flüssigkeitströpfchen freie Gasphasenionen entstehen können, existieren zwei Modelldarstellungen. Das ältere Modell des geladenen Rückstandes (*Charged-Residue Model*) stammt vom Wegbereiter des Elektrosprays M. Dole¹³⁰ und wurde von F. Röllgen¹³¹ zur *SIDT*-Theorie (*single ion in droplet theory*) ausgebaut. Beide Forscher postulieren, dass durch die aufeinanderfolgenden Coulomb-Explosionen (Zerfallskaskade) am Ende sehr kleine Tröpfchen ($\approx 1\text{nm}$) mit einem einzelnen Analytmolekül entstehen. Die Kollision mit N_2 -Molekülen als letztem Desolvatisierungsschritt führt letztendlich zur Freisetzung der Gasphasenionen. Das alternative Ionenemissionsmodell (*Ion Evaporation Model*) von J. Iribane¹³² und B. Thomson¹³³ geht von einer kontinuierlichen Freisetzung der Ionen in die Gasphase unterhalb des Rayleigh-Limits aus hochgeladenen Tröpfchen mit vielen Analytmolekülen aus. Zwar wird über beide Mechanismen in der Community heftig diskutiert, jedoch herrscht Konsens darin, dass die *CRM*-Theorie zur Beschreibung der Ionisation von Proteinen^{134,135}, die *IEM*-Theorie dagegen besser für kleinere Moleküle¹³⁶ geeignet ist.

Neben dem Verständnis zur Bildung freier Gasphasenionen aus Lösemitteltröpfchen ist die Interpretation des Elektrosprayprozesses als elektrolytische Zelle von enormer Bedeutung¹³⁷. Wie bereits beschrieben, führt das angelegte elektrische Feld zur Ladungstrennung. Im Postivmodus akkumulieren und verlassen Kationen als Tröpfchen die Flüssigkeitsoberfläche über den Taylor-Konus während Anionen (Gegenionen) zur positiven Kapillarspitze (Anode) wandern und dort ein Gegenpotential ausbilden. Der notwendige Ladungsausgleich findet über Oxidation an der Anode statt, ansonsten wäre das Elektrospraypotential ausgeglichen und der Sprayprozess würde zusammenbrechen. Um die Ladungsbilanz auszugleichen, muss der resultierende Strom I_F in seiner Größe dem Spraystrom I_{ES} entsprechen. Im Umkehrschluss müssen bei Erhöhung des Spraystromes genügend elektroaktive Komponenten durch eine ausreichende Flussrate bereit gestellt werden, um stabiles Elektrospray zu gewährleisten. Die Stellung in der elektrochemischen Spannungsreihe (geringstes Standardpotential E_0 zuerst) bestimmt die Oxidationsreihenfolge von Analyt, Elektrolyt oder Elektrodenmaterial im Redoxsystem Elektrosprayprozess. Aus der Erläuterung wird deutlich, warum pH-Wert (Ladungszustand), Verschleiß am Elektrodenmaterial (Änderung der Grenzfläche Kapillare/Flüssigkeit), Kapillarcoatings (Änderung des EOF) oder während der elektrophoretischen Trennung gebildete Gasblasen (Änderung/Unterbrechung der Flussrate) großen Einfluss auf das „sensible“ System Elektrospray haben¹³⁸.

Vor allem vor dem Hintergrund bioanalytischer Fragestellungen mit geringsten Probenvolumina führte die Miniaturisierung der pneumatischen ESI-MS (*Ionspray*) zur Entwicklung der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie (nanoES-MS), die bei geringeren Spitzendurchmessern auch ohne Anlegen eines externen Druckes funktioniert. Prinzip und Vorteile dieser Technik gegenüber ESI-MS sollen im Folgenden diskutiert werden.

2.2.1 Nanoelektrospray-Massenspektrometrie nach Wilm und Mann

Im Allgemeinen wird bei konventionellen ESI-MS-Analysen mit Spitzendurchmessern (i. d.) von 100 μm gearbeitet und Eluent und Probe durch Direktinjektion oder LC/MS-Kopplung mit Flussraten von rund 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in den Analysator eingeführt^{139,140}. Im Widerspruch dazu stehen jedoch für viele Anwendungen nur Probenvolumina von wenigen Mikrolitern zur Verfügung. In den meisten Fällen kann der Verlust an Sensitivität nicht in Kauf genommen werden, so dass sich die Proben-Verdünnung ausschließt. Aus diesem Grund existiert ein großer Bedarf an sensitiven Analysetechniken mit geringen Flussraten. 1994 stellten Emmett und Caprioli ihre „Mikrospray-Quelle“ vor¹⁴¹. Sie arbeitet druckunterstützt mittels Spritzenpumpe und besteht aus gepackten CE-Kapillaren, deren Spitzendurchmesser nach Eintauchen in Flusssäure (HF) auf 5-250 μm reduziert wurden. Die Konfiguration ermöglicht stabile Elektrosprays mit Flussraten im sub $\mu\text{l}/\text{min}$ -Bereich. Aufbauend auf der Theorie von Taylor¹²⁴ veröffentlichten Wilm und Mann im gleichen Jahr ihr theoretisches Modell zum Elektrosprayprozess, in dem sie explizit den Zusammenhang zwischen Emitterzone des Taylor-Konus (entspricht der Tröpfchengröße) und der Flussrate diskutieren¹⁴². Neben der mathematischen Herleitung und dem Vergleich mit experimentellen Daten beinhaltet die Arbeit außerdem den ersten Versuchsaufbau (Abb. 5) für die massenspektrometrische Detektion ohne externen Druck oder Nebulizng-Gas/Sheath-Flow-Unterstützung und schafft damit die wissenschaftlichen Grundlagen zur Anwendung der modernen Nanoelektrospray-Massenspektrometrie (nanoES-MS).

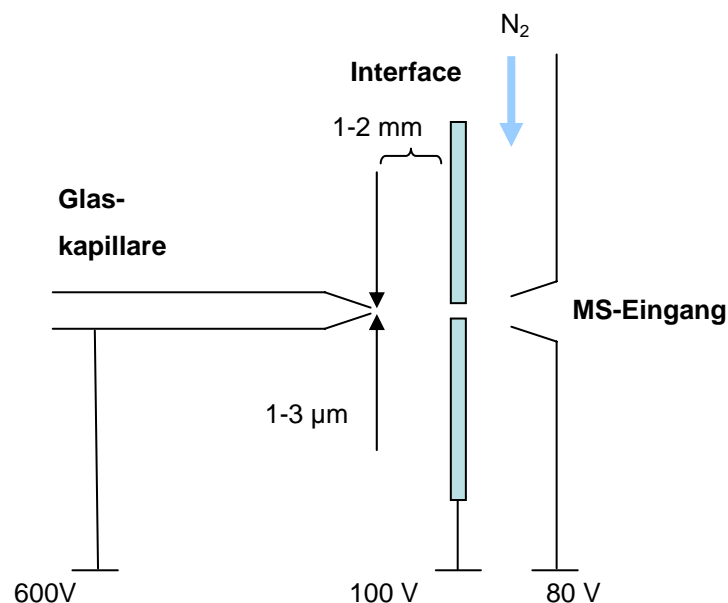


Abb. 5 Nanoelektrospray (nanoES)-Quelle von Wilm und Mann¹⁴²

Demnach wurden zum Versprühen der Analyten Borofloatglas-Kapillaren mit Öffnungen zwischen 1-3 μm verwendet. Sie können mittels Ziehgerät (Sutter Instrument Company/USA) in einfacher Weise reproduzierbar und in großen Stückzahlen hergestellt werden. Der Abstand zwischen Spitze und MS-Eingang betrug 1-2 mm und die elektrische Kontaktierung erfolgte über Goldbeschichtung. Die Reduzierung der Spitzenöffnung im ersten nano-ES-Setup zieht eine deutliche Verringerung der Flussrate auf 25 nL/min nach sich, ohne dass zur Generierung stabiler Elektrosprays externer Druck notwendig ist. Für 1 μl Probenvolumen ergibt sich demnach eine maximale MS-Analysenzeit von 50 min. Nach der Theorie von Wilm und Mann besteht Proportionalität zwischen dem Zonenradius der Tröpfchenemission (r_e) und der Flussrate^{2/3}. Die Korrelation wird in Abb. 6 und Gl. 6 verdeutlicht und zusammengefasst. Somit entsprechen Flussraten im nL/min-Bereich geringen Radien zur Emission am Taylor-Konus. Gegenüber pneumatischem Elektrospray (Ionspray) mit Tröpfchendurchmessern von 1-2 μm werden für nanoES auf diese Weise 100-1000fach geringere Tröpfchenvolumina mit Durchmessern unter 200 nm vorhergesagt¹⁴³.

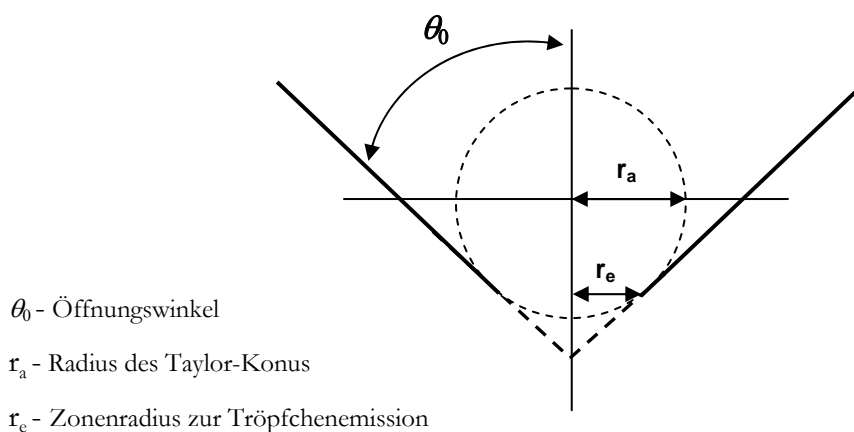


Abb. 6 Zone der Tröpfchenemission am Taylor-Konus nach Wilm und Mann¹⁴²

Gl. 6

$$r_e = \left(\frac{\rho}{4\pi^2 \gamma \tan\left(\frac{\pi}{2} - \theta_0\right) \left[\left(\frac{U_a}{U_T}\right)^2 - 1 \right]} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{dV}{dt} \right)^{\frac{2}{3}} \text{ Flussrate}$$

ρ - Dichte der Lösung

U_a - angelegte Spannung

γ - Oberflächenspannung der Lösung

U_T - Threshold-Spannung des Taylor-Konus (E_{Onset})

θ_0 - Öffnungswinkel des Taylor-Konus (49,3°)

dV/dt - Flussrate

Daneben existieren zwei weitere Modelle zur Berechnung des Tröpfchendurchmessers in Abhängigkeit von der Flussrate. Unter Berücksichtigung eines H₂O/MeOH/HAc-Elektrolyten und einer typischen Flussrate von 20 nL/min ermittelten Pfeifer und Hendricks¹⁴⁴ Tröpfchendurchmesser von 200 µm, die um Größenordnungen über den beobachteten Werten liegen und deshalb heftig umstritten sind¹⁴⁵. Im Gegensatz dazu, aber im Einklang mit Wilm und Mann, geben Fernandez de la Mora und Loscertales¹⁴⁶ Dimensionen im sub-µm Bereich an.

Konventionelles Ionspray und nanoES unterscheiden sich im Wesentlichen in drei Punkten: 1. Spitzendurchmesser (i.d.), 2. Druckunterstützung und 3. Mechanismus (Tröpfchendurchmesser), woraus sich weit reichende Konsequenzen ergeben. Gegenüber Ionspray ziehen geringere Tröpfchendurchmesser am Anfang die Reduzierung der Zerfallsschritte bis zur Entstehung der Gasphasenionen nach sich, was gleichzeitig einer geringeren Aufkonzentrierung von Analyt und Elektrolyt im nanoES-Prozess entspricht¹⁴⁷ und als verringerte Ionensuppression bezeichnet wird. Im Ergebnis zeichnet sich nanoES im Vergleich zu Ionspray außerdem mit einer höheren Toleranz gegenüber nicht flüchtigen Verbindungen aus. Nach Juraschek et al.¹⁴⁸ können mittels nanoES für 10 µmol/L Insulin (H₂O/MeOH/HAc-Elektrolyt) auch in Anwesenheit von 10 mmol/L NaCl aussagekräftige Massenspektren gewonnen werden. Wie bereits erörtert, werden im Massenspektrometer Gasphasenionen detektiert. Es ist Aufgabe des Ionisationsprozesses (ESI/nanoES) diese zu generieren. Entstehen, wie im ESI-Prozess, am Anfang der Zerfallskaskade große Tröpfchen, kommt es zur Akkumulation von Analytionen in den Resttröpfchen. Bis zum Eintritt in den Analysator können nicht alle Analytionen in die Gasphase transferiert werden. Aus diesem Grund werden für ESI-MS im Vergleich zu nanoES-MS geringere Sensitivitäten beobachtet. Im Umkehrschluss ermöglicht der Einsatz von nanoES die MS-Detektion von Analyten in geringen Konzentrationen. Dies gilt in wässrigen Elektrolyten insbesondere für Zucker, Glykoside und Glykoproteine, die mit Hilfe klassischer ESI-MS für die Analyse nur schwer zugänglich sind¹⁴⁹. Neben dem Mechanismus zur Bildung der Gasphasenionen besitzt die bei Nanoelektrospray aus dem Emitterdurchmesser resultierende Flussrate entscheidenden Einfluss auf die Ionisierungseffizienz¹⁵⁰. Deshalb hat die Definition und Reproduzierbarkeit einheitlicher Spitzengeometrien große Bedeutung für die Beurteilung und Diskussion des nano-ES-Prozesses. Geringe Flussraten, angepasst an kleine Probenvolumina, ermöglichen lange Analysenzeiten für MS/MS-Experimente zur Strukturaufklärung. Zusammen mit der verbesserten Kompatibilität gegenüber salzhaltigen Verbindungen und der gesteigerten Sensitivität ergeben sich für die nanoES-MS vielfältige Einsatzmöglichkeiten auf dem Gebiet der Bioanalytik^{151,152,153}. Dem Einsatz von nanoES-MS in der Routineanalytik steht zurzeit noch der große Aufwand beim Befüllen der Spitzen entgegen und setzt geübtes Personal voraus. Hier setzt die Entwicklung integrierter *lab-on-a-chip* Systeme mit hohem Automatisierungsgrad an.

2.2.2 Massenanalytoren

Zur Beurteilung von Massenspektrometern sind die beiden Parameter Auflösung (*Resolution*) und Genauigkeit (*Accuracy*) von großer Bedeutung. Die zur Bestimmung der Isotopenverteilung wichtige Auflösung beschreibt die Unterscheidbarkeit zweier Massenpeaks bei 10- bzw. 50% ihrer Signalintensität. Bei einem Gerät mit einer Massenauflösung von 10.000 können beispielsweise die Massenpeaks 10.000 und 10.001 oder 5.000 und 0,5 unterschieden werden. Für Time of Flight Geräte bezieht sich die Auflösung auf den einzelnen Massenpeak (*Full Width at Half Maximum*) und wird als Quotient von Massenpeak und Halbwertspeakbreite angegeben.

Die Genauigkeit stellt die Abweichung des Messsignals zur tatsächlichen molekularen Masse des Analyten dar. Abhängig vom Molekulargewicht wird zur Berechnung die monoisotopische und ab 5000 Da die mittlere Masse herangezogen¹⁵⁴. Vor allem in der Bioanalytik spielen die FT-ICR (Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz) und die seit 2005 verfügbaren Orbitrap Geräte (ohne Kühlung mit flüssigem Helium) aufgrund ihrer hohen Genauigkeit (sub ppm)¹⁵⁵ eine zentrale Rolle zur exakten Massenbestimmung. Alle Typen von Massenspektrometern haben ihre Vorteile und Beschränkungen (Preis). Tab.3 fasst die Leistungsdaten zusammen.

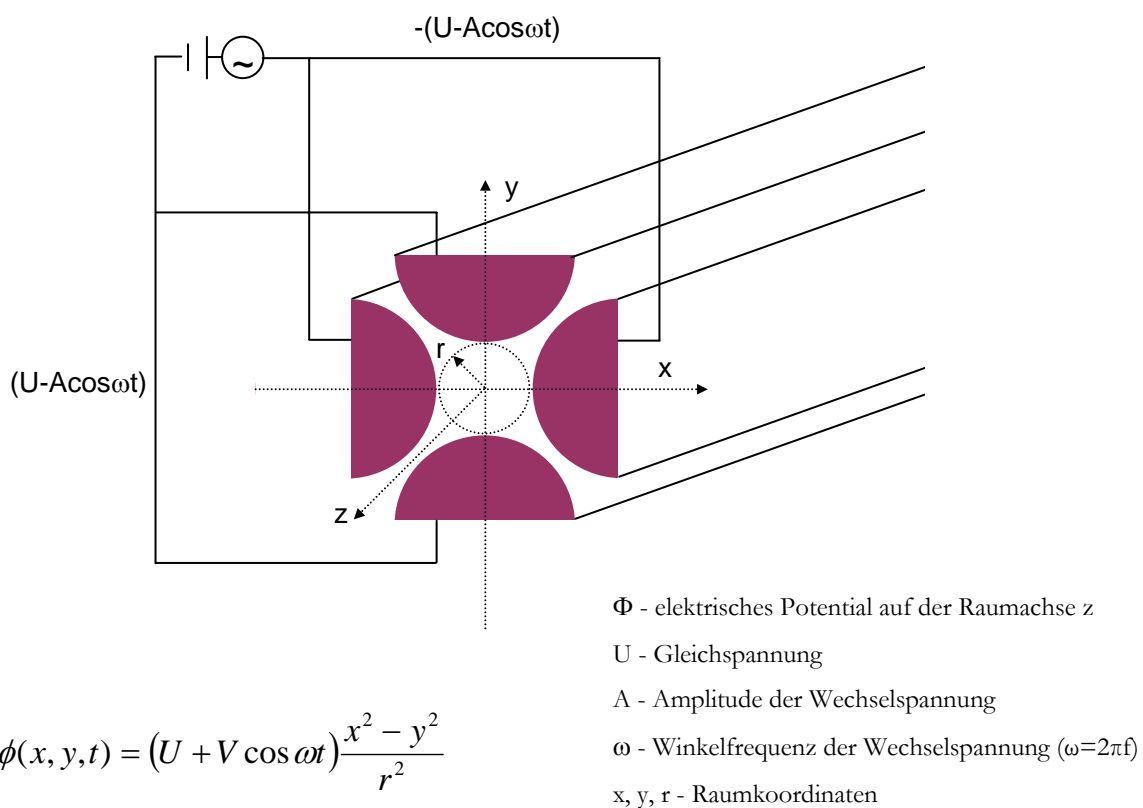
Tab. 3 Übersicht Typen von Massenanalytoren nach E. de Hoffmann und V. Stroobant¹⁵⁶

Massen-analysator	Massen-Bereich m/z [Th]	Auflösung FWHM (m/z 1000)	Genauigkeit [ppm]	Ionen-Sampling	Druck [Torr] 1 Torr=133Pa	Tandem MS
Quadrupol	4000	2000	100	kontinuierlich	10 ⁻⁵	MS/MS
Ion Trap (Ionenfallen)	6000	4000	100	gepulst	10 ⁻³	MS ⁿ
ToF (Time of Flight)	> 1 Million	5000	200	gepulst	10 ⁻⁶	-
TOF Reflektor	10.000	20.000	10	gepulst	10 ⁻⁶	MS/MS
Sektorfeld	20.000	100.000	< 10	kontinuierlich	10 ⁻⁶	MS/MS
FT-ICR	30.000	500.000	< 5*	gepulst	10 ⁻¹⁰	MS ⁿ
Orbitrap	50.000	100.000	< 5*	gepulst	10 ⁻¹⁰	-

*siehe Text

Quadrupol-Massenspektrometer

Quadrupol-Massenspektrometer wurden von Paul und Steinwedel an der Universität Bonn entwickelt und 1953 erstmals der Öffentlichkeit vorgestellt¹⁵⁷. Aufgrund des hohen Interesses wurden sehr schnell kommerzielle Systeme angeboten¹⁵⁸. Heute sind die robusten und preiswerten Analysatoren fester Bestandteil jedes MS-Labors zur Routineanalytik. Quadrupole bestehen aus vier Metallelektroden (hyperbolisch oder stabförmig), die abhängig vom anliegenden elektrischen Feld Ionen selektiv (m/z -Verhältnis) zum Detektor durchlassen und deshalb häufig auch als Massenfilter bezeichnet werden. Abb. 7 zeigt ihren prinzipiellen Aufbau.



$$\phi(x, y, t) = (U + V \cos \omega t) \frac{x^2 - y^2}{r^2}$$

Abb. 7 Elektrodenanordnung im Quadrupol-Massenspektrometer

Gegenüberliegende Elektroden sind miteinander verbunden. Beide Paare werden an einer Gleichspannungsquelle als Plus-, und Minuspol angeschlossen ist. Zusätzlich überlagert eine um 180° phasenverschobene Wechselspannung. Abhängig von eingestellter Gleich- und Wechselspannung passieren Ionen den Quadrupol auf stabilen Flugbahnen (Trajektorien). Zur Lösung der Differentialgleichungen zur Beschreibung der Ionenbewegung in der x-y-Ebene kann auf bekannte Lösungen der *Mathieschen Gleichungen* (Abb. 8) zurückgegriffen werden. Die erste

Lösung ergibt für das Ion stabile Flugbahnen mit unterschiedlichen Amplituden durch den Quadrupol wohingegen die zweite Lösung Kollisionen mit den Metallelektroden entspricht.

$$a = \frac{4zeU}{m\omega^2 r^2}$$

$$q = \frac{2zeA}{m\omega^2 r^2}$$

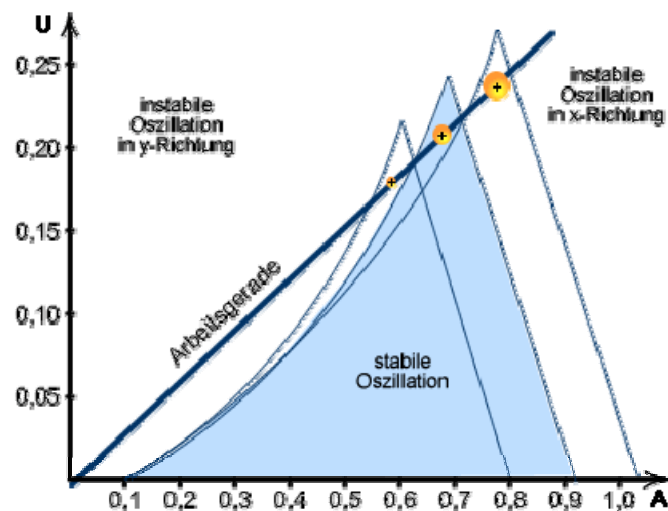
m - Masse des Ions

z - Ladung

e - Elementarladung

(andere Formelzeichen s. Abb.)

$$\frac{a}{q} = \frac{2U}{A} = konst.$$



$a/q = konst.$ entspricht Arbeitsgerade für stabile Ionen-Oszillation (Trajektorie) durch den Quadrupol zum Detektor

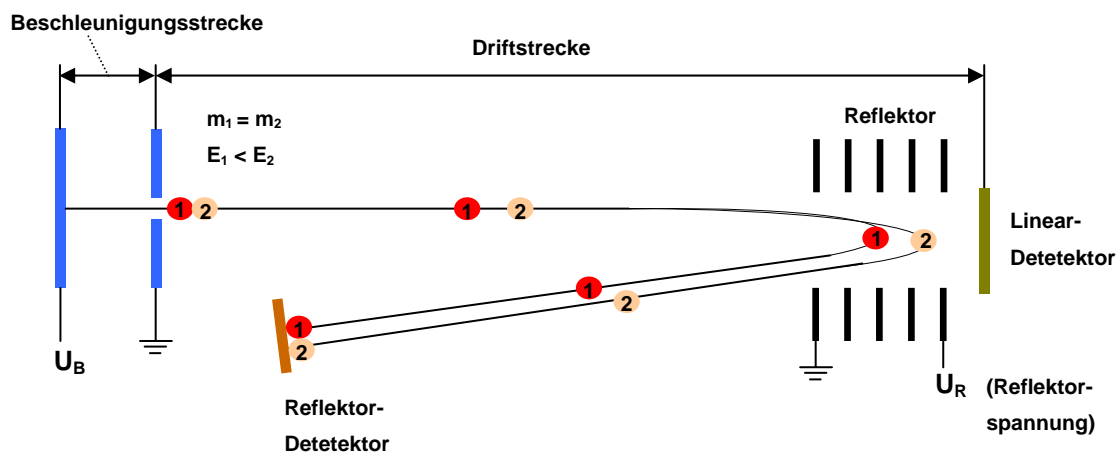
Abb. 8 Lösungen der Mathieschen Gleichungen und Stabilitätsdiagramm nach Chemgapedia¹⁵⁹

Als graphisches Ergebnis erhält man das Stabilitätsdiagramm (Abb. 8). In Abhängigkeit vom zu messenden Ion (m/z -Wert) sind die a/q -Werte (Variation von r , U , A und ω) interessant, die stabile Flugbahnen ermöglichen. In diesem Zusammenhang wird auch klar, warum es sich bei Quadrupol-Massenspektrometern (QMS) um scannende Instrumente handelt. Moderne QMS bieten Scangeschwindigkeiten bis $15000u/s$ ¹⁶⁰. Dadurch könnte zum Beispiel ein praxisrelevanter Massenbereich von $600 m/z$ mit einer Frequenz von $25Hz$ analysiert werden.

Neben dem einfachen Scanmodus ergeben sich durch Reihenschaltung mehrerer Analysatoren als Triple-Quadrupol (Q-Q-Q) vielversprechende Experimentierstrategien, die zusätzliche Strukturinformationen liefern. Beim Produkt-Ionen-Scan (*Product Ion Scan*) passieren definierte Ionen den ersten Quadrupol (Q1), werden im zweiten Quadrupol (Q2) als Kollisionszelle fragmentiert und im dritten Quadrupol (Q3) gescannt. Im Vorläufer-Ionen-Scan (*Precursor Ion Scan*) wird das umgekehrte Prinzip angewendet (Q1-Sanmodus/Q3-definiertes m/z -Verhältnis). Über den Neutralverlust-Scan (*Neutral loss Scan*) besteht die Möglichkeit während der Fragmentierung in Q2 entstandene Neutralteilchen nachzuweisen. Zur Steigerung der Sensitivität empfiehlt sich die Übertragung des *Selected Ion Monitorings* von Single-Quadrupol-Massenspektrometern auf Triple-Quadrupol-Systeme als *Selected Reaction Monitoring (SRM)* mit definierten m/z -Verhältnissen für alle Quadrupole.

Flugzeit-Massenspektrometer

Das Konzept des Flugzeit-Massenspektrometers (*Time of Flight*) wurde schon 1946 von Stephens eingeführt¹⁶¹. Wiley und McLaren entwickelten das Design zum Linear-ToF-MS mit verzögerter Ionenextraktion (*Delayed Extraction*) weiter¹⁶². Mit Entwicklung der gepulsten Ionisationsart MALDI durch Karas/Hillenkamp¹⁶³ und Tanaka¹⁶⁴ Ende der 80er-Jahre erzielte der ToF-Analysator (gepulstes Ionen Sampling) den großen Durchbruch. Abb. 9 zeigt Aufbau und Prinzip eines Flugzeit-Massenspektrometers. Die Ionen-Analyse kann sowohl im Linear- (ohne Reflektorspannung), als auch im Reflektor-Modus erfolgen. Herzstück der Methode ist die hoch genaue Messung der Flugzeit, die Ionen nach ihrer Beschleunigung zum Durchlaufen der feldfreien Driftstrecke benötigen und welche proportional zu ihrem m/z -Verhältnis ist. Theoretisch ist der zugängliche Massenbereich von Flugzeit-Massenspektrometern unbegrenzt, jedoch nimmt die Empfindlichkeit der Detektoren mit zunehmenden Molekülmassen ab.



$$\frac{m}{2} \left(\frac{L}{t} \right)^2 = zeU_B$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU_B}{L^2} t^2$$

$$E_{\text{kin}} = E_{\text{elek}}$$

m - Molekülmasse

z - Ladung

e - Elementarladung

U_B - Beschleunigungsspannung

t - Flugzeit => Messgröße

L - Driftstrecke

Abb. 9 Aufbau und Prinzip eines Flugzeit-Massenspektrometers mit Reflektor

Problematisch in Bezug auf eine korrekte Zeitmessung massengleicher Ionen ($m_1 = m_2$) ist ihre mögliche unterschiedliche Energieverteilung ($E_1 < E_2$) beim Eintritt in den Driftraum, die auf den Ionsisationsprozess und Zusammenstöße der Moleküle während der Beschleunigungsphase zurückzuführen ist. Infolgedessen ergeben sich für die ermittelten m/z -Werte breitere

Intensitätsverteilungen, was einer Herabsetzung der Massenauflösung entspricht. Die von Mamyrin erstmals vorgestellte Implementierung von Ionen-Spiegeln (Reflektoren) in linearen Instrumenten stellt eine wichtige Weiterentwicklung zur Steigerung von Auflösung und Massengenauigkeit dar¹⁶⁵. Im Vergleich zur Beschleunigungsspannung (U_B) werden am Reflektor (U_R) Faktor 1,05-1,1 höhere Spannungen angelegt, die zur Richtungsumkehr der Ionen führen¹⁶⁶. Gegenüber energieärmeren, langsameren Ionen können energiereichere, schnellere Ionen weiter ins Gegenfeld eindringen, legen dabei längere Wegstrecken zurück und benötigen am Ende somit die gleiche Flugzeit. Massengleiche Ionen unterschiedlicher Startenergie können aus diesem Grund zeitgleich, als scharfer Intensitätspeak (hohe Auflösung), detektiert werden. Analog zu Reflektor-Analysatoren dient die **verzögerte Ionenextraktion** (*Delayed Extraction*) ebenfalls zur Verbesserung der Massenauflösung. Abb. 10 stellt die Wirkungsweise schematisch dar.

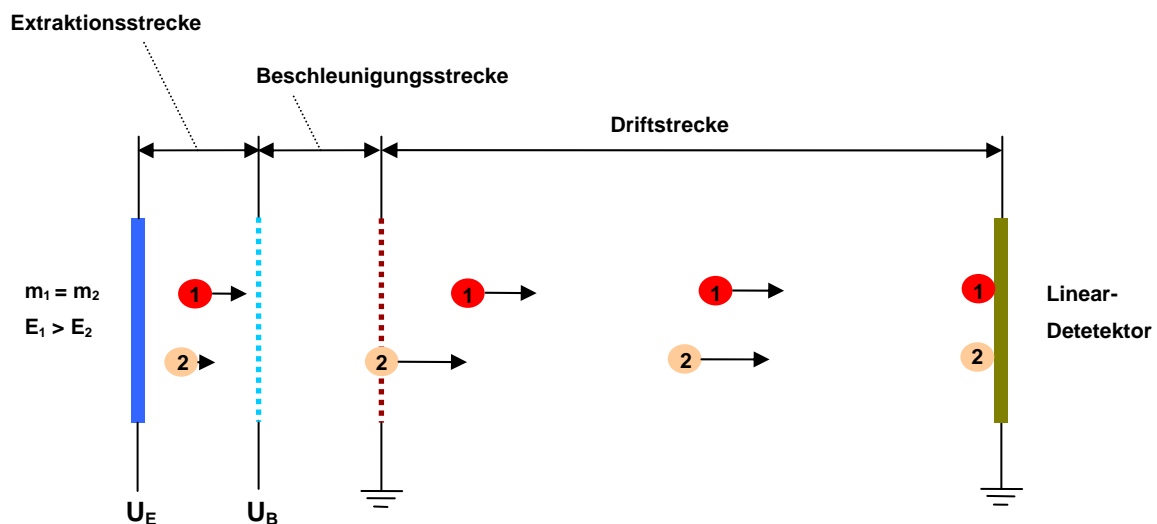


Abb. 10 Prinzip der verzögerten Ionenextraktion in einem Linear-ToF-MS (Erklärung s. Text)

Im dargestellten Fall weist Molekül 1 gegenüber dem massengleichen Molekül 2 eine höhere Startenergie auf (längerer Vektorpfeil) und entfernt sich deshalb während der Verzögerungszeit weiter weg vom Ausgangspunkt (z. B. MALDI-Probenteller). Wegen des größeren Abstandes erfährt Molekül 1 durch den Extraktionsimpuls (U_E) eine geringere Energie als Molekül 2 (niedrigere Startenergie). Aufgrund der erhöhten Bewegungsenergie gleicht Molekül 2 nach Beschleunigung (U_B) beim Eintritt in den feldfreien Driftraum den Rückstand gegenüber Molekül 1 aus und beide Ionen werden zeitgleich mit hoher Auflösung detektiert. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht außerdem in der Möglichkeit durch Energieeintrag (Extraktionsimpuls) die Bildung strukturspezifische Fragmentationen zu induzieren^{167,168}.

2.3 Mikrochip-MS-Kopplungstechniken

Abgeleitet von der historischen Entwicklung sind für die Darstellung des Stands der Technik auf dem Gebiet der Mikrochip-MS-Kopplung folgende drei Techniken relevant: *Sprühen von Kante*, *Externer-* und *Monolithisch integrierter Emitter*. Die große Forschungsaktivität auf diesem Gebiet spiegeln 5 Übersichtsartikel^{169,170,171,172,173} wieder, die seit 2005 erschienen sind. Für die vollständige thematische Behandlung sind außerdem die Möglichkeiten zur elektrischen Kontaktierung des Emitters von großer Bedeutung.

2.3.1 Sprühen von Kante

Bereits in den Anfangsjahren der *lab-on-a-chip* Forschung wurden von Ramsey¹⁷⁴ und Karger¹⁷⁵ 1997 die ersten Kopplungen mikrofluidischer Glasschips mit der Elektrospray-Massenspektrometrie beschrieben. Beiden Arbeiten ist der identische Ansatz „Sprühen von Kante“ (Abb. 11) gemeinsam. Dabei wird das Elektrospray direkt an der äußeren Öffnung des mikrofluidischen Chips erzeugt. An der Chipkante, als großer Emitterfläche, kommt es aufgrund des geringen Kontaktwinkels wässriger Elektrolyten auf vergleichsweise hydrophiler Glasoberfläche zur Ausbildung eines relativ großen Tropfens, der als Totvolumen wirkt. Dieses Phänomen verschlechtert die Effizienz integrierter Trennverfahren nachhaltig. Möglichkeiten dem negativen Effekt entgegenzuwirken sind die Hydrophobisierung der Sprühkante oder die Verwendung von porösen Polymeren als Membranen¹⁷⁶ oder monolithische stationäre Phasen¹⁷⁷ im Kanalausgang. Für elektrophoretische Trennungen mit hoher Auflösung ist die Generierung von stabilem Elektrospray ohne Anlegen von externem Druck vorteilhaft. Während in der Arbeit von Ramsay ausreichender elektroosmotischer Fluss induziert werden konnte, musste bei Karger eine externe Flussrate von 100-200nl/min appliziert werden.

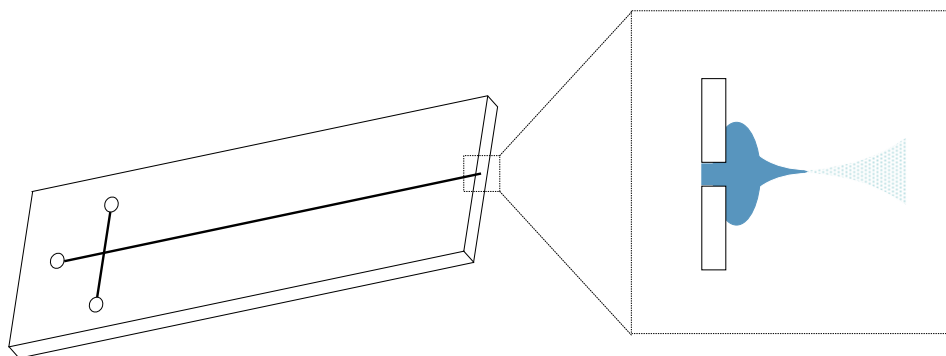


Abb. 11 Mikrochip-MS-Kopplungstechnik „Sprühen von Kante“

2.3.2. Externer Emitter

Bei dieser am weitesten verbreiteten Variante der Chip-MS-Kopplungstechnik werden manuell eingepasste FS (*Fused Silica*) Kapillaren oder nanoES Nadeln als externe Emitter eingesetzt. Als Chipsubstrate finden sowohl Glas^{178,179,180,181,182} als auch verschiedene Kunststoffe wie Polycarbonat (PC)¹⁸³, Polydimethylsiloxan (PDMS)^{184,185,186}, Polymethylmethacrylat (PMMA)^{187,188} oder Zeonor^{189,190} Verwendung. Charakteristisch für diesen Ansatz ist die deutliche Reduzierung der Emitterfläche (Abb. 12), was der Tropfenbildung und damit der Entstehung von Totvolumen entscheidend entgegenwirkt. Es muss davon ausgegangen werden, dass an der Schnittstelle zwischen Chip und eingepasstem Emitter durch Bohrungen^{191,192} oder Verschraubungen^{193,194} Totvolumen entsteht. Auch wurden bereits Chip-MS-Kopplungen mit dünnen integrierten Emitterplättchen^{195,196,197} vorgestellt. Die zeitaufwendige und störanfällige Assemblierung des Emitters erfordert in jedem Fall hohes handwerkliches Geschick des Experimentators und steht damit im Widerspruch zu den Anforderungen der Massenproduktion von Werkzeugen für Hochdurchsatzscreening-Applikationen.

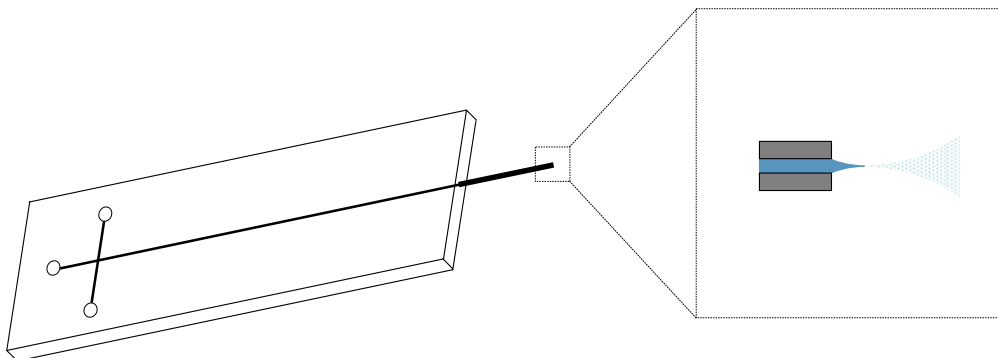


Abb. 12 Mikrochip-MS-Kopplungstechnik „Externer Emitter“

Aus der Vielzahl der interessanten Veröffentlichungen stechen zwei Arbeiten hervor, die eindrucksvoll das Potential der MCE-MS-Kopplung im Hinblick auf die Herausforderungen auf dem Gebiet der Proteomforschung aufzeigen. Schon 2000 konnten die Gruppen um B. L. Karger¹⁹⁸ und P. Thibault¹⁹⁹ anspruchsvolle elektrophoretische Chiptrennungen mit MS-Detektion realisieren. Auffallend bei Karger ist der Aufbau als subatmosphärisches Interface (78kPa) zur Generierung eines stabilen Elektrosprays. Neben Peptiden und Proteinen wurden auch tryptische Verdauere von Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*) und Membranproteinen aus *Haemophilus influenzae* (gramnegatives Bakterium) analysiert. Zur Verbesserung der Trenneffizienz wurden Kapillarcoatings aus Polyacrylamid, Polyvinylalkohol (PVA) und BCQ *[(acryloylamino)propyl]trimethylammoniumchlorid* eingesetzt.

2.3.3. Monolithisch integrierter Emitter

Beim monolithisch integrierten Emitter handelt es sich um die Methode der Wahl zur Kopplung mikrofluidischer Systeme mit der Elektrospray-Massenspektrometrie. Es gibt keine Schnittstelle zwischen Emitter und Chip, denn beide Komponenten bestehen aus einem Substrat. Das konische Zulaufen der Emitterspitze führt zur Reduzierung der Wandstärke und damit zum Aufheben der Emitterfläche. Totvolumen tritt somit praktisch nicht mehr auf.

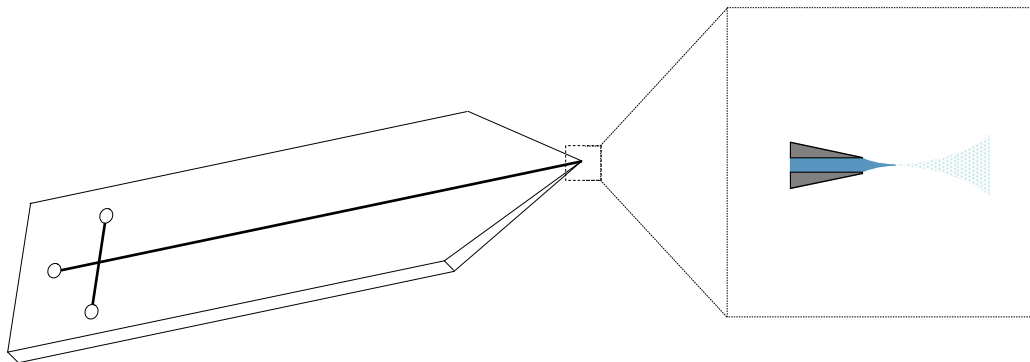
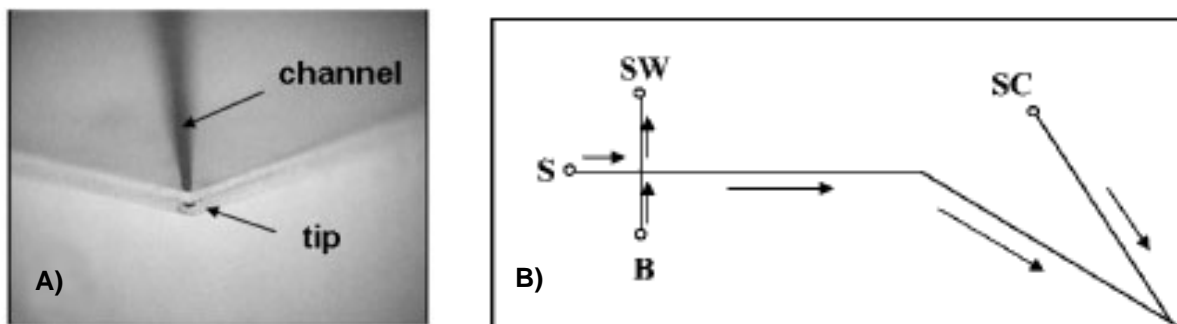


Abb. 13 Mikrochip-MS-Kopplungstechnik „Monolithisch integrierter Emitter“

Zur Herstellung monolithischer Emitter in Kunststoffen existiert eine Vielzahl etablierter Fertigungstechniken: Heißprägen²⁰⁰ und Abformen von PDMS^{201,202} oder PMMA²⁰³, SU-8 Fotolack^{204,205,206,207} (Photolithographie), Mikrofräsen in PMMA^{208,209} und Laserablation von PC²¹⁰. Die Firma Dyconex (Zürich, Schweiz) entwickelte für die Mikroelektronikindustrie ein spezielles Plasma-Ablationsverfahren, das auch zur Herstellung von Emitterchips in Polyimid (PI)²¹¹ Verwendung findet. Rossier et al.²¹² realisierten damit ein Chip-Mikrospraysystem zur Detektion mittels Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS). Seit einiger Zeit ist der erste kommerzielle monolithische Emitterchip^{213,214} am Markt erhältlich. Er wird durch Laserablation in Polyimid hergestellt und enthält neben dem Emitter außerdem unpolare Trennphasen für die chromatographische Probenanreicherung und Stofftrennung. Für Hochdurchsatzscreening-Applikationen (HTS) erscheint die Implementierung mehrerer Emitter auf einem Chip vorteilhaft^{215,216,217,218}. Ziel der Entwicklung ist die Anpassung der Emitterzahl auf das standardisierte 96well-Format²¹⁹. Reaktives Iontiefenätzen (*Deep Reactive Ion Etching*) stellt ein effektives Verfahren zur Herstellung von Multiemitterchips dar, die als Kassetten²²⁰ eingesetzt werden. Die Firma Advion (Ithaca, USA) vertreibt einen auf Silizium basierenden externen Zerstäuberchip^{221,222}, der zur Direktinfusion oder als Interface für die LC/MC-Kopplung eingesetzt werden kann.

Die Herstellung monolithischer Emittter mit sich verjüngender Sprühspitze gewinnt in Glas aufgrund seiner vorteilhaften Eigenschaften (chemische Resistenz und optische Transparenz) zunehmend an Bedeutung, obwohl dessen Fertigung aufwendiger ist als die in Kunststoffen²²³.

Eine dennoch einfache Möglichkeit zur Generierung des monolithischen Emittter in Glas ist das Zuschleifen²²⁴ der 4 Chipkanten am Kanalausgang. Die resultierende Ausbildung des Taylor-Konus ist unabhängig von Kanten und erlaubt die stabile MS-Detektion von Lysozym. Jedoch ist bei der manuellen Vorgehensweise die zentrische Positionierung des Kanals im Emittter problematisch. Ein Ausweg ist das Anschleifen von nur 2 Chipkanten, das jedoch die Emittterfläche vergrößert (Totvolumen). Eine Weiterentwicklung stellen die erst vor kurzem (2008) veröffentlichten Arbeiten von Freire et al.²²⁵ und von Mellors et al.²⁷ dar. Ihnen sind die geringe Substratdicke von nur 0,3 mm und der Kanalausgang an der Chipecte gemeinsam. Der photolithographische Herstellungsprozess reduziert die Emittterfläche deutlich und stellt die zentrische Positionierung des Kanals im Emittter sicher (Abb. 14).



A) nach Freire et al. ²²⁵

B) nach Mellors et al. ²⁷

Abb. 14 Monolithischer Chip-MS Emittter

SW-Sample Waste, S-Sample, B-Buffer, SC-Side Channel

Während Freire et al. vergleichende Chip-MS Experimente (Direktinfusion) durchführten, verwendeten Mellors et al. ihren Chip für die MCE-MS-Kopplung. Durch Serpentineführung wurde die Länge des elektrophoretischen Trennkanals vervierfacht und dadurch die Trennstufenzahl drastisch gesteigert. Zusammen mit der Einführung des positiv geladenen Kanalcoatings PolyE-323^{226,227} zur Unterdrückung der Wandadsorption konnten somit anspruchsvolle Trennungen von Peptiden, Proteinen und tryptischen BSA-Verdau ausgeführt werden. Der nächste Schritt zur vollständigen *lab-on-a-chip* Analyse von Realproben wäre nun die Implementierung von Prozessierungseinheiten, z. B. zur Probenvorbereitung oder Protein-Spaltung. An dieser Stelle soll hervorgehoben werden, dass keine der vorgestellten Arbeiten mit Glas als Chipsubstrat, die Generierung einer monolithischen, sich verjüngenden Sprühspitze mit reduzierter Wandstärke am Kanalausgang beinhaltet. Hier setzt unsere Entwicklungsarbeit an, mit dem Ziel den Herstellungsprozess für einen monolithisch integrierten Emittter zu etablieren.

2.3.4. Elektrische Kontaktierung

Bei der Kopplung der Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie (MCE-MS) stellt die elektrische Kontaktierung am Emitter eine große Herausforderung dar. Ziel ist es, die Feldstärke der elektrophoretischen Trennung und die Elektrosprayspannung der MS-Detektion unabhängig voneinander zu definieren. Zum besseren Verständnis der elektrischen Begebenheiten wird in Abb. 15 das aus der Mikrochipelektrophorese bekannte Ersatzschaltbild²²⁸ auf die MCE-MS erweitert. Außerdem werden die verschiedenen Möglichkeiten zur elektrischen Kontaktierung des Emitters vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile diskutiert.

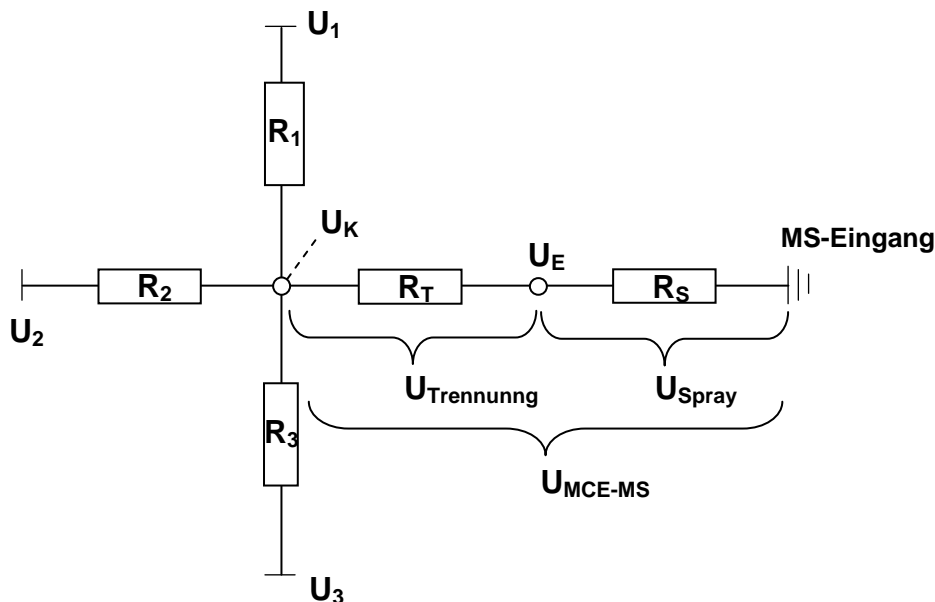


Abb. 15 Ersatzschaltbild der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie Kopplung

U_{1-3} - elek. Spannung in Zugangsvials / R_{1-3} - spez. Widerstände zwischen Zugangsvials und Injektionskreuz

U_K - elek. Spannung im Injektionskreuz / U_E - elek. Spannung am Emitter

R_T - spez. Widerstand des Trennkanals / R_S - spez. Widerstand zwischen Emitter und MS-Eingang

Das **Serielle Layout** ist die einfachste Variante der Chip/MCE-MS-Kopplung und kommt ohne direkte elektrische Kontaktierung des Emitters aus^{183,191}. Wie Abb. 15 und 16A aufzeigt, liegt Reihenschaltung der spez. Widerstände des Trennkanals und des Elektrosprayprozesses ($U_{MCE-MS} = U_{Trennung} + U_{Spray}$) vor. Dabei wird der elektrische Strom im Trennkanal durch den hohen elektrischen Widerstand des Sprayprozesses (Luftspalt zwischen Emitter und MS-Eingang) und nicht durch seinen eigenen spezifischen Widerstand begrenzt. Ein zweiter Nachteil des Seriellen Layouts ist der Injektionsmodus. Da während der Injektionsphase keine Rücklaufspannung am

Emitter definiert werden kann, findet im Trennkanal auch keine Rücklaufströmung und damit Probenfokussierung im Injektionskreuz statt. Wie später noch gezeigt wird, kommt es stattdessen zu Bandenverbreiterung durch Probendiffusion in den Trennkanal. Dies entspricht geringeren Trenneffizienzen.

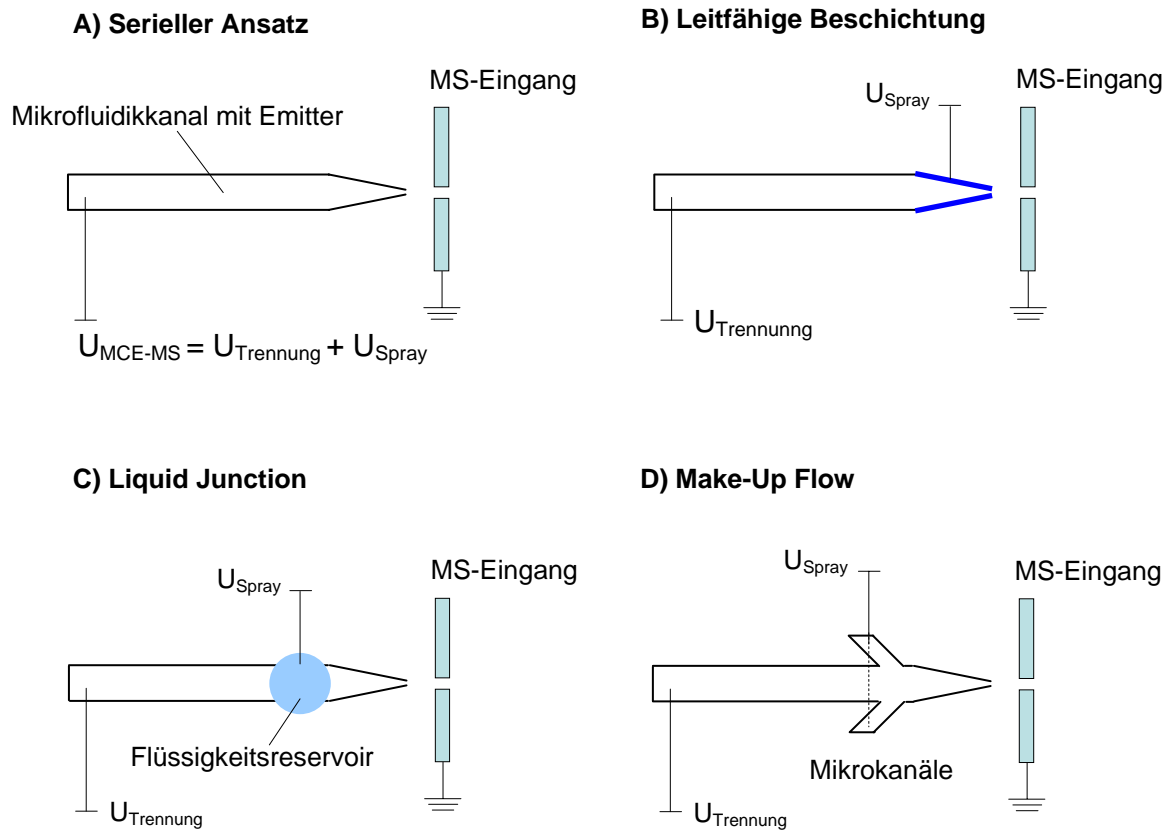


Abb. 16 Möglichkeiten der elektrischen Kontaktierung des Emitters zur Kopplung von Mikrofluidikchips und Massenspektrometrie

Wie aus Abb. 16 hervorgeht, liegt bei jeder Art der elektrischen Kontaktierung der MS-Eingang auf Masse (0 kV). Wird MS-Detektion im Postivmodus vorausgesetzt, schließt diese Anordnung positives Elektrospraypotential am Emitter ein. Bei MS-Detektion im Postivmodus kann aber auch der Emitter geerdet sein und der MS-Eingang auf negativem Potential liegen. Diese patentierte Variante der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) hat den großen Vorteil, dass keine Hochspannung direkt am Emitter anliegen muss und wird in vielen kommerziellen Systemen angewendet.

Die **leitfähige Beschichtung** des Emitters (Abb. 16B) gestattet dessen direkte elektrische Kontaktierung und damit die exakte Definition der Elektrosprayspannung. Die elektrophoretische Feldstärke ergibt sich aus der Differenz der Spannungen im Injektionskreuz (U_K) und am Emitter (U_E) bezogen auf die Trennstrecke. Außerdem erlaubt dieser Modus die Probenfokussierung durch Pinzetteninjektion (weniger Bandenverbreiterung) und damit höhere Trenneffizienzen. Aus der Literatur ist eine Vielzahl von Beschichtungen z.B. mit Gold^{229,230}, Graphit^{231,232} oder Polymeren^{233,234} bekannt, die auch in der *Sheathless*²³⁵ CE-MS-Kopplung Verwendung finden. Dieses Interface weist im Vergleich zur *Sheathflow*²³⁶ Variante, bei vergleichbaren Nachweisempfindlichkeiten, eine geringere Signalstabilität auf²³⁷. Sehr vielversprechend ist der Einsatz von Polyanilin (PANI)^{238,239}. Dieses leitfähige Polymer soll als grüner, transparenter Film gut auf Glas haften und beständig gegen elektrische Entladungen sein.

Liquid Junction/Make-Up Flow

Neben der leitfähigen Beschichtung ist dies der am weitesten verbreitete Ansatz. Die elektrische Kontaktierung des Emitters erfolgt über mit Elektrolyt gefüllte Reservoirs und verbundene Mikrokanäle^{174,182,186,189,192,193,198}. Vorteilhaft ist die Unabhängigkeit gegenüber mechanischen oder elektrischen Abrieb, nachteilig sind resultierendes Totvolumen und Probenverdünnung an der Schnittstelle zwischen Trennkanal und Emitter. Eine interessante Modifikation des *Liquid Junction* Ansatzes stellt die von Kelly et al.²⁴⁰ vorgestellte „*Liquid Electrode*“ dar. Hierbei erfolgt die für den Elektrosprayprozess notwendige elektrische Kontaktierung aus einem Hilfskanal über den Taylor-Konus auf den Probenkanal. Das Elektrospray dieses Emitterchips zeichnet sich durch hohe Signalstabilität in einen weiten Bereich applizierbarer Flussraten (50-1000nl/min) bei Sprühpotentialen bis 1,2kV aus und entspricht somit einem hohen Grad an Flexibilität für die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie.

Membranen

Eine andere Möglichkeit zur Kontaktierung des Emitters ist die Verwendung semipermeabler Dialysemembranen^{241,242}. Lazar et al.²⁴³ implementierten eine elektrisch durchlässige Glasmembran in den photolithographischen Herstellungsprozess, über die die Elektrosprayspannung angelegt wird. In der Praxis konnte sich bisher keine dieser Kontaktierungen durchsetzen.

3 Experimenteller Teil

Im Mittelpunkt des experimentellen Teils stehen Geräte und Arbeitsschritte der Emitterfertigung. Die genaue Beschreibung ermöglicht die hohe Reproduzierbarkeit der Spitzengeometrie nach dem Herstellungsprozess. Daneben werden in diesem Kapitel der Arbeitsplatz zur Durchführung der Experimente vorgestellt sowie alle verwendeten Chemikalien und Geräte aufgeführt.

3.1 Emitterfertigung

Abb. 17 beinhaltet die Arbeitsschritte zur Emitterfertigung im Fließschema. Alle benötigten Geräte wurden in den feinmechanischen Werkstätten am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr und an der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg konstruiert und hergestellt.

Ausgangspunkt im Herstellungsprozess sind kommerziell erhältliche Elektrophorese-Mikrochips (Micronit/Niederlande). Nach dem CNC-Fräsen stehen am Kanalausgang Mikrozapfen mit einem Durchmesser von $d=0,3$ mm zur Verfügung. Um die zentrische Position des Trennkanals im Mikrozapfen sicherzustellen, erfolgt das Ausrichten des Fräskopfes kameraunterstützt. Der Mikrozapfen wird mittels Platin-Heizwendel zu einer Emitterspitze ausgezogen und deren Mikrofluidikkanal durch Ätzen mit Flusssäure reproduzierbar geöffnet.

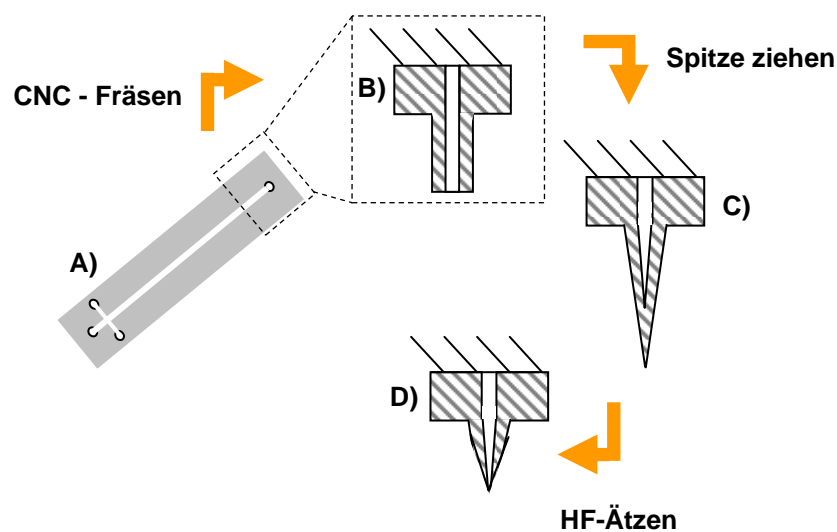


Abb. 17 Fließschema zur Emitterfertigung - A) kommerziell erhältlicher Mikrochip B) CNC gefräster Mikrozapfen ($d=0,3$ mm) C) Spitze mit veredetem Mikrokanal D) geätzte Emitterspitze mit reduzierter Wandstärke

3.1.1 Fräsen

Erster und aufwendigster Schritt im Herstellungsprozess des Emitterchips ist das CNC-Fräsen (*Computerized Numerical Control*) des Mikrozapfens. Das Verfahren wurde in der Feinmechanik am MPI für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr entwickelt und konnte ohne Probleme auf die anderen Werkstätten an den Universitäten Regensburg und Leipzig übertragen werden.

Mit einem Fräskopf von $d=1$ mm werden mit $U= 10.000/\text{min}$ am Kanalausgang des Chips Mikrozapfen mit einem Durchmesser von $d= 0,3$ mm hergestellt. Die Grobausrichtung der Chips (Abb. 18A) erfolgt in einer Messinghaltervorrichtung mittels Mikrometerschrauben unter einem Binokular (Olympus SZ51). Um die zentrische Positionierung des Mikrofluidikkanals im Mikrozapfen sicherzustellen, wurde zusätzlich die kameraunterstützte Feinausrichtung in den Herstellungsprozess implementiert. Die Verwendung der Mikrokamera WAT-704R (Wartec/Japan) ermöglicht das exakte Ausrichten des Fräskopfes auf den Chipkanal. Abb. 18B zeigt die mechanische Halterung in deren Messinghülse die Kamera einschließlichs eines speziellen Teleobjektivs von 24 mm Brennweite (Proxeon-Odense/Dänemark) integriert wurde. Die damit erzielte Vergrößerung ist ausreichend um auf einem 20"-Monitor (Kucera-Walldürn/Deutschland) das Kanalprofil sichtbar zu machen. Nach der Ausrichteprozedur wird der 15minütige Fräsprozess an einer programmierbaren CNC-Maschine gestartet.

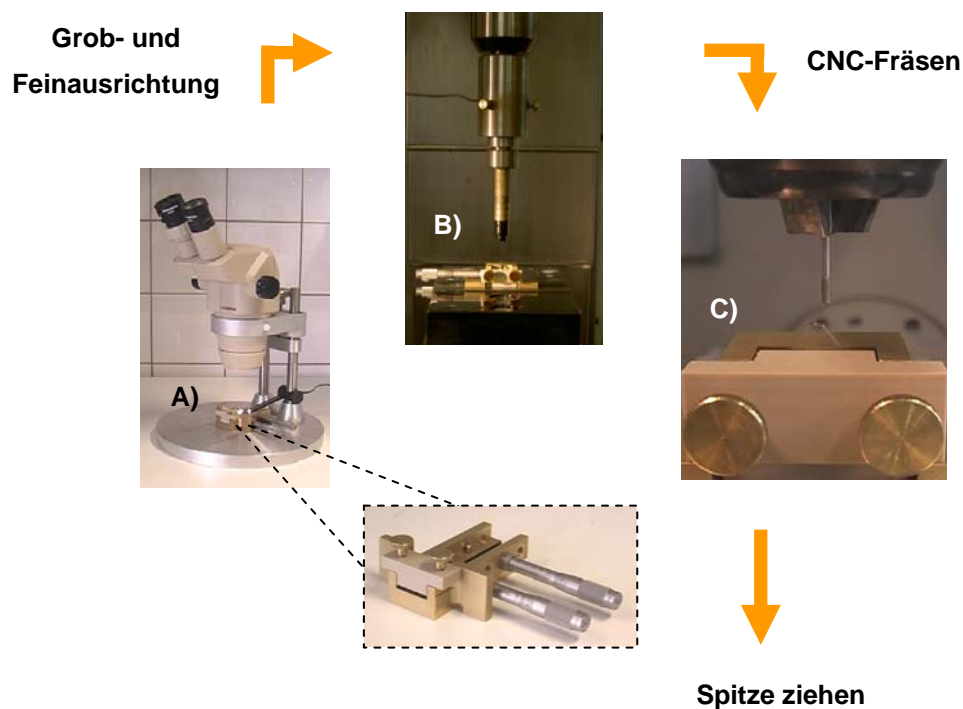


Abb. 18 CNC-Fräsen des Mikrozapfens - A) Grobausrichtung des Mikrochips in Haltevorrichtung mit Binokular B) Mikrokamera und Haltevorrichtung C) CNC-Fräskopf und Mikrochip

3.1.2 Ziehapparatur

Nach dem CNC-Fräsen wird der Mikrozapfen zu einer Spitze ausgezogen. In Anlehnung an kommerzielle Geräte aus der CE wurde zu diesem Zweck am MPI für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr eine Ziehapparatur speziell für Mikrochips konstruiert. Zentraler Bestandteil ist eine Platin-Heizwendel, die in alle 3 Raumrichtungen mikrometergenau positioniert werden kann. Ein Gleichrichter (TDK Lambda) bringt die Heizwendel bei 70A Stromstärke zum Glühen. Dadurch wird am Mikrozapfen ein exakt positionierbarer Glasstick angeschmolzen.

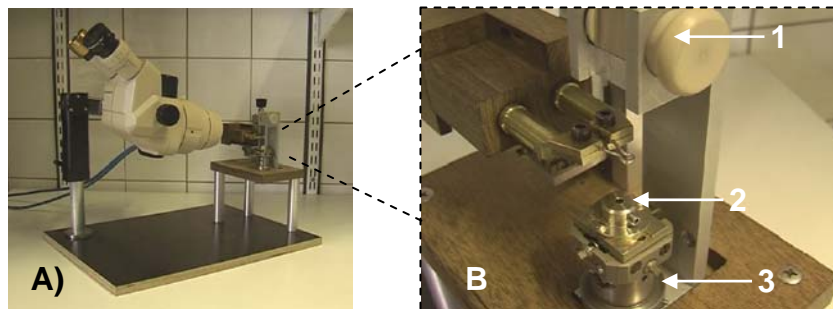


Abb. 19 Ziehapparatur mit Binokular A) und in Detailansicht B) mit (1) Chipaufnahmevorrichtung (2) Platinheizwendel verstellbar in x,y,z-Richtung und (3) Glasstickhalterung verstellbar in x,y,z-Richtung

Wie aus der videomikroskopischen Dokumentation des Ziehprozesses hervorgeht, erfolgt das Ausziehen der Spitze in 3 Schritten. Zuerst wird der Glasstick passgenau unter dem Mikrozapfen positioniert und durch Glühen der Heizwendel angeschmolzen (Abb. 20A-D). Danach wird die Platin-Heizwendel 1-2 mm in z-Richtung verschoben (Abb. 20E). Durch erneutes Glühen der Heizwendel und dem Eigengewicht der Glasstick-Haltevorrichtung wird der Mikrozapfen zur Spitze ausgezogen (Abb. 20F-H). Erfahrungsgemäß können aus einem Mikrozapfen 2-4 Spitzen ausgezogen werden, wobei der Ziehprozess selbst hohes handwerkliches Geschick voraussetzt.

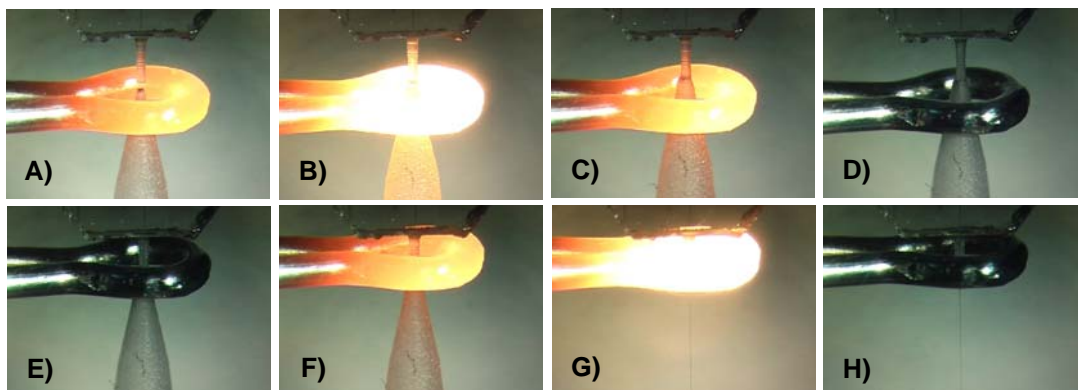


Abb. 20 videomikroskopische Dokumentation des Ziehprozess zur Herstellung monolithischer Emitterspitzen A-D) Anschmelzen des Glassticks, E) Verschieben der Pt-Heizwendel in z-Richtung, F-H) Ausziehen der Spitze

3.1.3 Ätzstation

Die Verfahrensschritte CNC-Fräsen und Spitze ziehen konnten bereits in der Feinmechanik am MPI für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr etabliert werden. Um reproduzierbare Emittergeometrien zu ermöglichen, wurde in Analogie zur Apparatur von Turner²⁴⁴, während der Diplomarbeit von M.Eschner²⁴⁵ zusätzlich das Ätzen mit Flußsäure ($\text{SiO}_2 + 4 \text{HF} \rightleftharpoons \text{SiF}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$) in den Herstellungsprozess implementiert. Ermöglicht wurde dies durch intensive Zusammenarbeit mit der Feinmechanik an der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg.

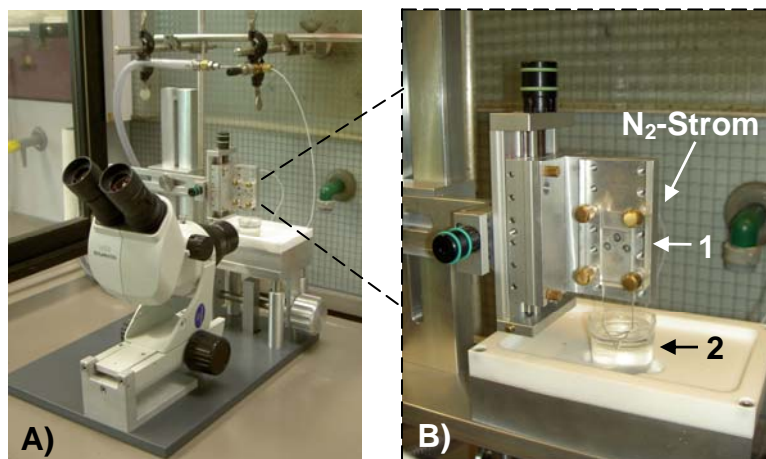


Abb. 21 Ätzstation mit Binokular A) und in Detailansicht B) mit 1) Chipalterung und 2) Behälter mit Flußsäure

Abb. 21 zeigt die auf einer Hebebühne montierte Ätzstation. Sie besteht aus einer mittels Mikrometerschrauben in x,y,z-Richtung verstellbaren Chipalterung inklusive N_2 -Anschluss. Zur Prozesskontrolle dient das Olympus-Binokular SZ51 mit Vorsatzlinse (80fache-Vergrößerung). Der in Abb. 22 dargestellte 20minütige Ätzvorgang findet in einem HF resistenten Behälter aus Polymethylpenten (PMP) statt, der passgenau in die weiße Teflonsicherheitswanne eingebettet ist. Das Entweichen von HF Dämpfen wird durch Überschichtung mit Parafinöl verhindert. Der angelegte N_2 -Strom zeigt durch Blasenbildung das Ende der Prozedur an und verhindert zudem das Aufätzen im Kanalinneren.

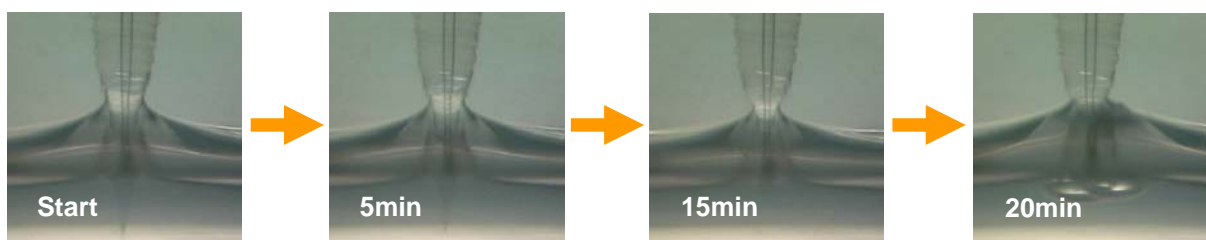


Abb. 22 Prozesskontrolle des Ätzvorganges mit Flußsäure zur Herstellung monolithischer Emitterspitzen

3.2 Arbeitsplatz

Zur Durchführung der MCE-MS-Experimente konnte neben den wertvollen Erfahrungen auch auf Geräte und Bauteile bereits bestehender Systeme zurückgegriffen werden. Zum Befüllen der Mikrochips wurde die Vakuumpumpe RZ 2.5 (Vacuubrand/Deutschland) eingesetzt. Neben der Kontrolle der Mikrokanäle auf Blasenfreiheit vor Messungen, dient das Lichtmikroskop Olympus IX71 (Hamburg/Deutschland) zusammen mit dem Panasonic-Camcorder NV-GS400 der Qualitätskontrolle und Dokumentation während der Emitterfertigung. Elektrische Spannungen werden mittels 4-Kanal-Hochspannungsquelle HCN35-35000 (FUG / Rosenheim, Deutschland) erzeugt und über Elektrodenplatten an den Zugangsöffnungen der Mikrochips angelegt.

3.2.1 MS-Interfaces

Zusammen mit der Entwicklung eines Fertigungsprozesses für die Herstellung monolithisch integrierter Emitterspitzen in Glaschips stellen die Eigenbau-Interfaces zur Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie (CE/MCE-MS) die wesentlichen technischen Neuerungen dieser Arbeit dar. Beide MS-Interfaces sind in Abb. 23 dargestellt. Zur exakten Positionierung des Emitters vor dem MS-Eingang haben sie x,y,z-Bühnen gemeinsam. Wesentlicher Unterschied ist die räumliche Anordnung der Emitter. Um übermäßigen Eintrag an Lösemittel in die Massenspektrometer zu vermeiden, wird beim CE-

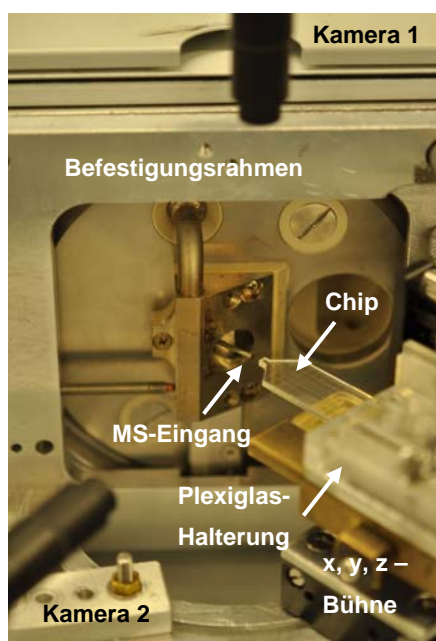


Abb. 23A Chip/MCE-MS-Interface

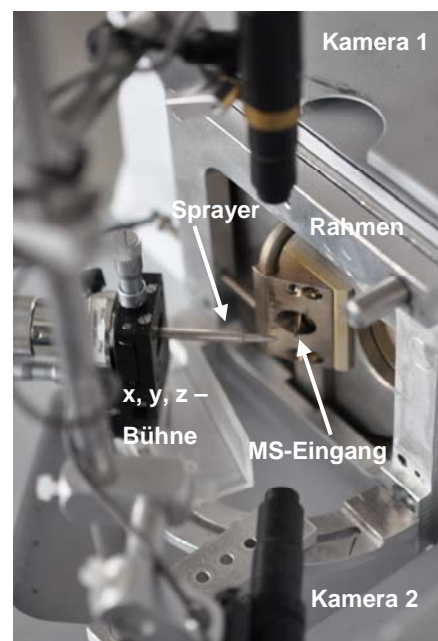


Abb. 23B CE-MS-Interface mit Agilent Sprayer

MS-Interface das Elektrospray im rechten Winkel und in einem Abstand von 2-3 mm zum MS-Eingang appliziert. Dagegen ist beim Chip/MCE-MS Interface aufgrund geringster Flussraten die Positionierung des Emitters nur direkt vor dem MS-Eingang möglich.

3.2.2 Massenspektrometer

Im Rahmen dieser Arbeit standen zwei MS-Systeme zur Verfügung. Während beim Leco ToF-MS (Abb. 24B) die Anzahl der Messungen unabhängig vom Massenbereich stufenweise bis auf 100 Hz erhöht werden kann, ergibt sie sich beim Shimadzu Quadrupol-MS (Abb. 24A) als Scanrate aus dem *Scan Speed* (Scankapazität) und dem gewählten Massenbereich. Erfolgt die Detektion beispielsweise mit 6000 u/s zwischen 10-600 m/z ergibt sich eine Scan Rate von 10 Hz. Wird der Massenbereich auf 10-1200 m/z verdoppelt, halbiert sich die Scan Rate auf 5 Hz. Folgerichtig muss zur Analyse schnellerer Trennungen mit dem Quadrupol-MS bei hohen Scanraten der Massenbereich begrenzt werden. Tab. 4 fasst die Standardeinstellungen zusammen.



Abb. 24A Shimadzu Single-Quadrupol-MS



Abb. 24B Leco ToF-MS

Tab. 4 Standardeinstellungen der verwendeten Massenspektrometer

Parameter	Shimadzu Quadrupol-MS	Leco ToF-MS
Acquisition Type	Scan/Selected Ion Monitoring (SIM)	Vollspektren
Massenbereich:	10 - 2000 m/z	1-6000 m/z
Scan Speed	4000-6000 u/s	
Scan Rate/Messungen	(siehe Text)	bis 100 Hz
Detector Voltage	1,5 kV	2,4 kV
Heat Block / CDL Temp.	200 / 250 °C	Interface Temp. 80 °C

3.3 Chemikalien und Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind zur besseren Übersicht in Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5 Verwendete Chemikalien, deren Qualität und Lieferanten

Name	Qualität/Konzentration	Lieferant
Methanol	für LC-MS (99,9%)	Fluka
Acetonitril	für HPLC (99,9%)	Sigma-Aldrich
Ameisensäure 85%	reinst	Merck
Essigsäure 96%	zur Analyse	Merck
Ammoniumformiat	≥ 99%	Fluka
Ammoniumacetat	zur Analyse	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	zur Analyse	Merck
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Ephedrin	98%	Sigma-Aldrich
Leucin-Enkephalin	≥ 96%	Fluka
Ubiquitin (from bovine red blood cells)	≥ 98%	Fluka
Angiotensin I	zur Analyse	Sigma-Aldrich
Gramicidin (from Bacillus brevis)	Gramicidin A, B, C, D	Fluka
Somatostatin	99%	Sigma-Aldrich
Neurotensin	93%	Sigma-Aldrich
Physalaemin	98%	Sigma-Aldrich
Substanz P Acetat	≥ 95%	Sigma-Aldrich
Bradykinin Acetat	≥ 98%	Sigma-Aldrich
Eledoisin	99%	Sigma-Aldrich
Gramin	99%	Sigma-Aldrich
Yohimbin Hydrochlorid	99%	Sigma-Aldrich
Primaquin Diphosphat	98%	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin	98%	Fluka
Sparfloxacin	98%	Fluka
Reserpin	zur Analyse	Sigma-Aldrich
Spermin	99%	Fluka
Spermidin	99%	Fluka
Arginin	≥98.5%	Sigma-Aldrich
Nicotinsäure	zur Analyse	Merck
Nicotinamid	für biochemische Zwecke (99,5%)	Merck
Amilorid Hydrochlorid	98%	Sigma-Aldrich
Bendroflumethazid	zur Analyse	Sigma-Aldrich
Bumetanid	98%	Sigma-Aldrich
Polyanilin (PANI)	0,5/2-3 wt. % in Xylol	Sigma-Aldrich
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	2 % in H ₂ O	Fluka
D-(+)-Maltose Monohydrate	≥ 99%	Fluka
Rinderserumalbumin (BSA)	zur Analyse (von M.Link - Universität Regensburg)	

3.3.1 Geräte

Zur Optimierung der Trennstufenzahl und Auflösung wurden zwei kommerzielle Geräte eingesetzt. Messungen in der Kapillarelektrophorese erfolgten mit dem CE-System P/ACE MDQ (Abb. 25) und Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid als Testgemisch in den Konzentrationen 80/26/21,9/37 µg/mL. Die Kapillare mit einem Innendurchmesser i. d. = 75 µm hatte eine Länge von 60 cm, was bei 20 kV angelegter Spannung einer Feldstärke von $E = 333 \text{ V/cm}$ entspricht und wurde bei 20 °C konstant temperiert. Die UV-Detektion erfolgte nach 50 cm Kapillarlänge bei 200 nm. Die Probe wurde hydrodynamisch während 6 s Vakuum (0,0345 bar) injiziert. Alle Daten wurden mittels systemeigener Software 32 Karat 7.0 ausgewertet. Um konstante Oberflächeneigenschaften zu gewährleisten, wurde die Quarzkapillare konditioniert. Vor einer Messreihe: 5 min H₂O dest. / 15 min 0,1 M NaOH und dazwischen: 2 min H₂O dest. / 5 min 0,1 M NaOH / 2 min H₂O dest. / 5 min Elektrolyt.



Abb. 25 CE-System P/ACE MDQ
(Beckman Coulter - Krefeld/Deutschland)



Abb. 26 CE-MS Sprayer
(Agilent - Waldbronn/Deutschland)

Mit Hilfe des Agilent Sprayers (Abb. 26) konnten außerdem Referenzmessungen von 100 µg/mL Spermin, Arginin und Nicotinamid in der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS) durchgeführt werden. Die Kapillarlänge betrug 50 cm (i. d. = 50 µm) was bei Spannungen zwischen 20-35 kV Feldstärken von $E = 400-700 \text{ V/cm}$ entspricht. Die elektrokinetische Probeninjektion mit 20 kV dauerte standardmäßig 5 s. Zu Initiierung und Unterstützung des Elektrosprays bei 4 kV wurde als *Sheath-Liquid* 0,1 Vol% Ameisensäure in 60 Vol% 2-Propanol mit 2 µL/min und N₂ als Zerstäubergas appliziert. Die Konditionierung in der CE-MS erfolgte manuell mit 5 min 0,1 M NaOH / 1 min H₂O dest. / 5 min Elektrolyt und optional: 5 min 0,01 Vol% HPMC / 1 min H₂O dest. / 5 min Elektrolyt als Spülschritte.

3.3.2 Herstellung der Lösungen

Alle Analyten wurden in abs. Methanol gelöst und als Stammlösung für die weitere Verwendung bereitgestellt. Salze und Carbonsäuren wurden zur Herstellung der Elektrolytlösungen in Reinstwasser gelöst und entsprechend verdünnt. Mittels Vortexer wurden alle Lösungen vor Gebrauch homogenisiert. Verstopfungen der Mikrofluidikkanäle durch Schmutzpartikel aus Umgebungsluft und Lösungen stellen die Hauptursache für Ausfälle der Nanoelectrospray-Nadeln und Emitterchips dar. Um das Risiko zu verringern, wurden alle Analysenlösungen vor ihrer Verwendung für drei Minuten zentrifugiert und nur der Überstand verwendet.

3.3.3 Konditionierung der Mikrochips

Zur Sicherstellung konstanter Oberflächeneigenschaften der Mikrofluidikkanäle wurden alle Glas-Mikrochips (Micronit Microfluidics BV/Enschede, Niederlande) vor ihrem Einsatz einem einheitlichen Konditionierungsprotokoll unterzogen. Zuerst wurde mit einer 1:1-Mischung aus konz. H_2SO_4 und 30%-igem H_2O_2 (Piranha-Lösung) geätzt, anschließend ausgiebig mit H_2O gespült und 0,1 M Natronlauge angesaugt. Nach einem erneuten Waschschrift mit H_2O wurden die Mikrochipkanäle mit Elektrolyt gespült, befüllt und vor ihrem Einsatz mittels Lichtmikroskop auf Blasenfreiheit überprüft.

3.3.4 Elektrische Kontaktierung

Die Gold-Beschichtung des Emitterchips durch Kathodenzerstäubung (*sputtering*) wurde in der Elektronenmikroskopie am Institut für Anorganische Chemie / Universität Regensburg am Lehrstuhl von Prof. Dr. A. Pfitzner durchgeführt. Bei Verwendung von PANI als leitfähiger Beschichtung konnte auf Ergebnisse der Diplomarbeit von M.Eschner zurückgegriffen werden. Das Beschichten mit PANI erfolgte nach Reinigung der Chipoberfläche (MeOH) durch direktes Aufspritzen des leitfähigen Polymers mittels Sprühpistole (Conrad Electronics). Nach Einspannen in der PMMA-Halterung der HF-Ätzapparatur verhindert der angelegte N_2 -Strom das Verkleben des Mikrokanals in der Chip-Spitze. Das als 0,5 oder 2-3%-ige Dispersion in Xylol vorliegende PANI wurde unverdünnt oder mit MeOH verdünnt (1:5) innerhalb kurzer Sprühstöße appliziert. Als alternative Methode zum Aufspritzen wurde außerdem das Eintauchen des Emitterchips in PANI-Lösung durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Blickpunkt steht die Einführung monolithisch integrierter Emittter an mikrofluidischen Glaschips für die massenspektrometrische Detektion (Abb. 27).

Am Anfang dieses Kapitels wird auf die Herausforderungen während des Herstellungsprozesses eingegangen. Im zweiten Teil zur Charakterisierung von Nanoelektrospray wird neben der Untersuchung zur MS-Kompatibilität verschiedener Elektrolyte die Sprayperformance klassischer Nanospray-Nadeln und Emitterchips in Abhängigkeit vom Emitterdurchmesser verglichen. Außerdem wird die neu entwickelte Chip-MS-Technik zur massenspektrometrischen Detektion einiger Testsubstanzen eingesetzt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Verwendung des neuen Emitters zur totvolumenfreien Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie (MCE-MS). Nach Beschreibung der verwendeten Testgemische und der Optimierung der Trennbedingungen mit Hilfe klassischer Kapillarelektrophorese und der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE/CE-MS) stehen die Ergebnisse aus der MCE-MS zur Diskussion. Für die elektrische Kontaktierung des Emitters kann auf das Serielle Layout und die Verbindung des Trennkanals über Mikrokanäle (Make-Up Flow) zurückgegriffen werden. Außerdem wird der Einfluss beider Konfigurationen auf den Injektionsprozess untersucht. Zum Abschluss dieses Kapitels werden einige Anwendungen vorgestellt. Neben dem Einsatz zur *Online*-Analyse eines tryptischen Proteinverdaues bilden ultraschnelle MCE-MS Analysen dabei den Schwerpunkt.

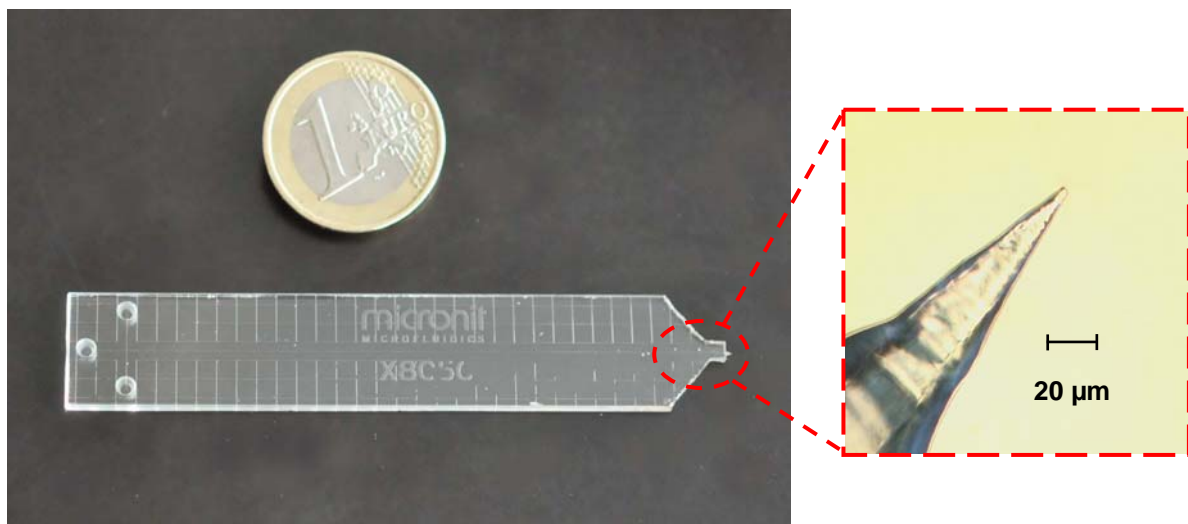


Abb. 27 Elektrophorese-Chip mit monolithisch integriertem nanoES-Emitter (Innendurchmesser i.d. = 3 µm)

4.1 Herstellung des monolithisch integrierten Emitters

Während in Kapitel 3.1 die Verfahrensschritte CNC-Fräsen, Spitze ziehen und Ätzen mit Flusssäure sowie die daran beteiligten Geräte im Mittelpunkt stehen, sollen an dieser Stelle die daraus erzielten Ergebnisse zur Herstellung des monolithischen nanoES Emitters diskutiert werden. Nach dem CNC-Fräsen steht der Mikrozapfen mit $d=0,3\text{mm}$ zur Verfügung. Er ist in Abb. 28A-C im Vergleich zu einem Streichholz, in der elektronenmikroskopischen Frontansicht und in der lichtmikroskopischen Seitenansicht dargestellt. Die exakte zentrische Positionierung des mikrofluidischen Kanals im Mikrozapfen ist dabei gut zu erkennen. Zur Reduzierung des Kanaldurchmessers wird der Mikrozapfen mit Hilfe einer Pt-Heizwendel und einem Glasstick zu einer Spitze ausgezogen. Die lichtmikroskopische Abbildung 28D zeigt sehr schön den verödeten Mikrofluidikkanal. Um den Strömungswiderstand im Mikrofluidikkanal zu begrenzen, sind geringe Verödungslängen vorteilhaft. Optimale Ergebnisse konnten mit einem Ziehweg von 3 mm erzielt werden. Bei genauerer Beobachtung stellt man fest, dass der Quotient von äußerem Emitterdurchmesser und Kanaldurchmesser an jeder Stelle der ausgezogenen Spitze konstant ist.

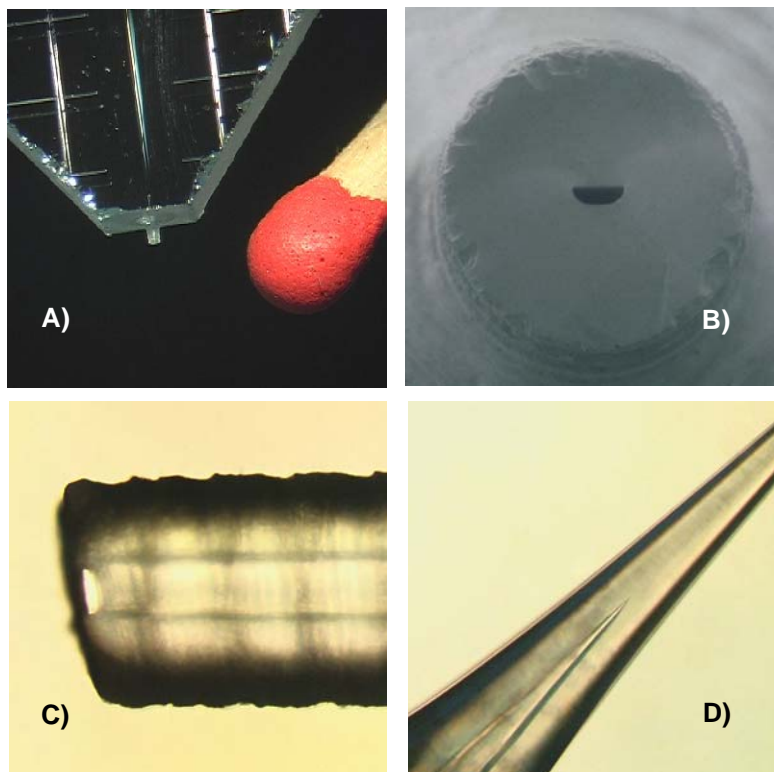


Abb. 28 CNC-gefräster Mikrozapfen A) im Vergleich zu einem Streichholz (10fache-) B) in elektronenmikroskopischer Frontansicht (213fache-) C) in lichtmikroskopischer Seitenansicht D) Spitze mit verödetem Mikrofluidikkanal (je 200fache-Vergrößerung)

4.1.1 Vermeidung von Totvolumen

Im Folgenden wird die Notwendigkeit des Ätzens mit Flusssäure zur Generierung eines totvolumenfreien Emitters erläutert. Dieser Verfahrensschritt wurde während der Diplomarbeit von M.Eschner²⁴⁵ an der Universität Regensburg in den Herstellungsprozess integriert. Für den Einsatz in der MCE-MS-Kopplung muss der verödete Mikrofluidikkanal nach dem Ausziehen der Spitze wieder geöffnet werden. Analog zu Experimenten^{143,150} mit nanoES Nadeln kann die gezogene Spitze mit einem geeigneten Gegenstand, z. B. einer Nähnadel, abgebrochen werden. Durch diesen nicht reproduzierbaren Schritt ergibt sich neben der Bruchkante (Abb. 29A-1) eine Emitterfläche die ungefähr dem 20fachen des Kanalquerschnittes entspricht und Totvolumen darstellt (Abb. 29A-2). Die Hydrophilie der Glasoberfläche wirkt sich zusätzlich negativ aus, da sich der im wässrigen Elektrolyt gelöste Analyt gut auf der Emitterfläche verteilen kann. Der abgebrochene Emitter entspricht damit eher dem klassischen Ansatz „Sprühen von Kante“. Eine signifikante Verbesserung stellt dagegen das HF-Ätzen dar. Das Abtragen von Glassubstrat durch die Flusssäure führt zu einem konisch zulaufenden Emitter (Abb. 29B-1) der sich durch eine extrem geringe Wandstärke auszeichnet (Abb. 29B-2). Die Emitterfläche wird fast vollständig reduziert und das Totvolumen praktisch vermieden.

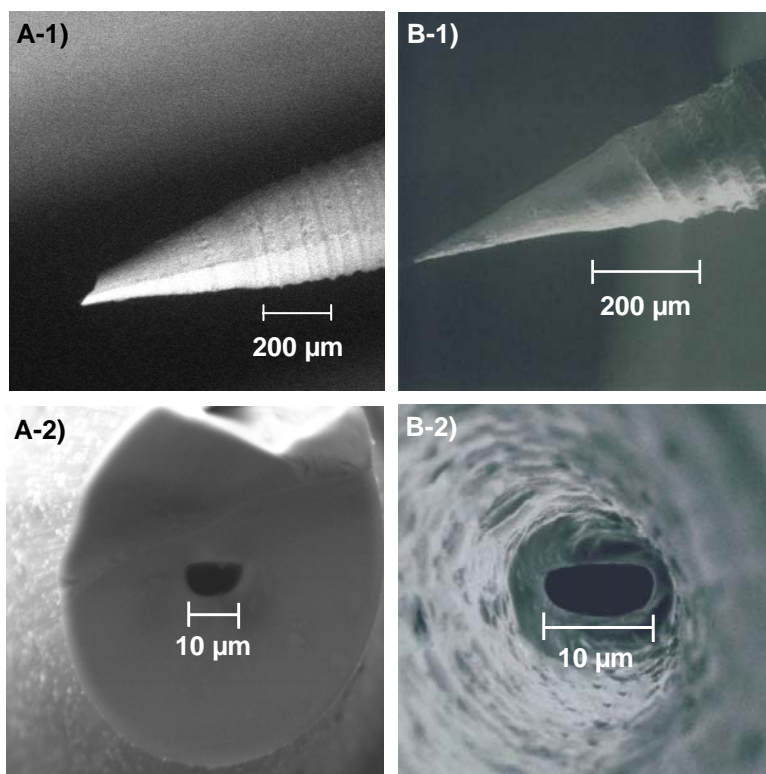


Abb. 29 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der abgebrochenen A) und geätzten Spitze B) in Seitenansicht 1) und Frontansicht 2)

4.1.2 Leitfähige Beschichtungen

Für die Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie (MCE-MS) ist die direkte elektrische Kontaktierung des Emitters eine besondere Herausforderung (S. 38 - 2.3.4). Gelingt diese, ist es möglich die Elektrosprayspannung der MS-Detektion und die Feldstärke der elektrophoretischen Trennung unabhängig voneinander zu definieren. Neben Gold-Beschichtungen wurde Polyanilin (PANI) als leitfähige Beschichtung für monolithisch integrierte Glasemitter eingeführt. Zwar konnte die prinzipielle Verwendbarkeit durch Chip-MS Experimente nachgewiesen werden, für die praxistaugliche MCE-MS Kopplung scheint dieses Polymer jedoch ungeeignet. Ursache dafür ist der schon nach wenigen Experimenten sichtbare Abrieb (Abb. 30) aufgrund der hohen lokalen Feldstärke an der Emitterspitze. Außerdem verstärkt das wiederholte Befüllen der Mikrochips durch Eintauchen der Emitterspitze die Abriebtendenz. Wie Chip-MS Messungen zeigten, verursacht die unterbrochene Beschichtung Signalinstabilitäten des Totalionenstromes bis hin zum kompletten Signalabbruch.

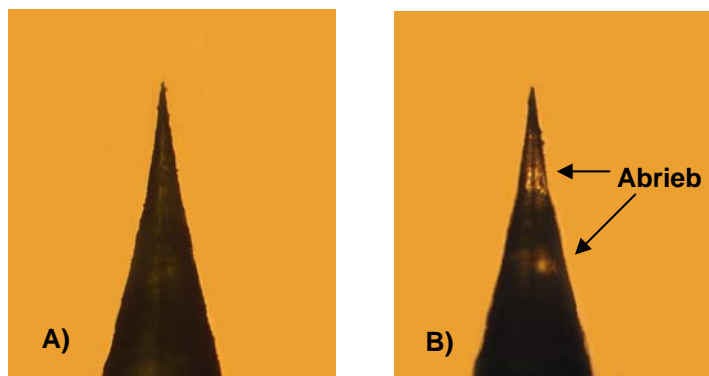


Abb. 30 Lichtmikroskopische Abbildung (200x) des nanoES Emitters mit leitfähiger Polyanilinbeschichtung A) und nach 3 MS-Messungen mit erneutem Befüllen des Mikrochips bei 1,5kV angelegtem Elektrospannungspotential B)

Im Rahmen ihrer Masterarbeit an der Universität Leipzig untersuchte S.Fritzsche²⁴⁶ weitere aus der Literatur bekannte Beschichtungssubstanzen auf ihre Eignung in der *Sheathless* CE-MS-Kopplung. Im Mittelpunkt standen Kathodenzerstäubung (*Sputtering*) mit Gold, Abscheidung von Gold auf silanisierter Glasoberfläche^{247,248}, die Goldbeschichtung mittels „*fairy dust*“-Technik²⁴⁹, die Tollens-Reaktion und die Beschichtung mit Silberleitlack²⁵⁰. Letzteres Verfahren lieferte in der *Sheathless* CE-MS zufriedenstellende Ergebnisse, konnte jedoch aufgrund unzureichender Haftung auf der Emitteroberfläche bisher noch nicht auf die MCE-MS übertragen werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit der Serielle- und der Make-Up Flow Ansatz als elektrische Kontaktierung für die MCE-MS-Kopplung favorisiert. Beide Methoden konnten erfolgreich eingesetzt werden.

4.2 Charakterisierung von Nanoelektrospray

In der theoretischen Darstellung der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie (nanoES-MS) wurde bereits ausführlich auf die Bedeutung des Emitterdurchmessers eingegangen. Die experimentelle Analyse der Korrelation zwischen Emittergeometrie und Sprayperformance ist Teil dieses Kapitels. Demgegenüber steht die Untersuchung des Einflusses der verwendeten Elektrolyten auf die MS-Detektierbarkeit der Analyten (Ionensuppression). Zur Charakterisierung von Nanoelektrospray wurde als Testsubstanz das Alkaloid Ephedrin (Abb. 31) ausgewählt.

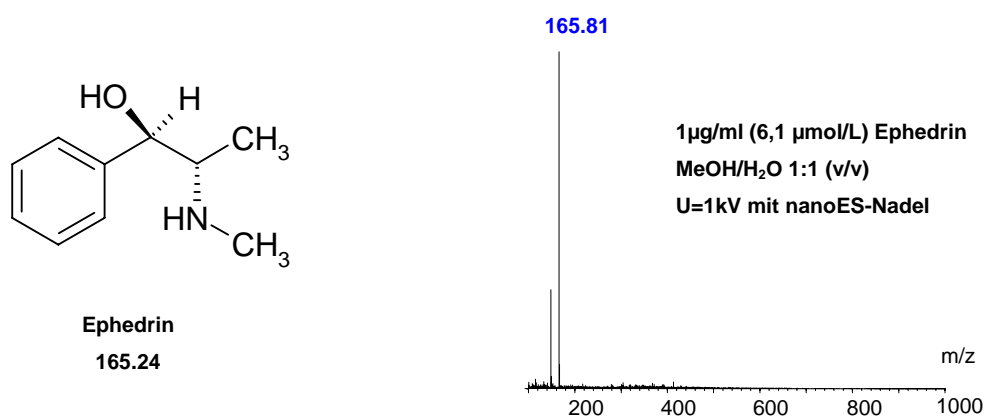


Abb. 31 Struktur und MS-Referenzspektrum von Ephedrin als Testsubstanz zur Charakterisierung von nanoES-MS

4.2.1 MS-Kompatibilität von Elektrolyten

Die flüchtigen Elektrolyte Ammoniumformiat, Ammoniumacetat, Ameisensäure und Essigsäure sind in der massenspektrometrischen Detektion weit verbreitet. Deshalb stehen diese Substanzen am Anfang der Messungen zur MS-Kompatibilität mit Nanospray-Nadeln (Spitzendurchmesser $d = 10\text{--}15\ \mu\text{m}$, $U = 0,8\text{--}1\ \text{kV}$). Etablierte kapillarelektrophoretische Trennpuffer beinhalten häufig nicht flüchtige 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) oder Phosphate. Ihre Verwendung liefert geringe Peakbreiten der Analyten und führt dadurch zu hohen Trenneffizienzen und Auflösungen. Deshalb wurden auch diese Verbindungen auf ihre MS-Kompatibilität hin untersucht. Die Experimente wurden beginnend mit der Referenz in MeOH/H₂O 1:1 (v/v) (ohne Elektrolyten) mit steigender Elektrolytkonzentration durchgeführt, wobei sich der Zusatz von Methanol als organischem Modifizier (Verringerung der Oberflächenspannung) positiv auf die Ausbildung und Stabilität des Elektrosprays auswirkt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde je Elektrolyt-Messreihe eine neue Nanospray-Nadel verwendet. MS-Spektren von Ephedrin in Abb. 32 stellen die Detektierbarkeit in Abhängigkeit vom Elektrolyt gegenüber.

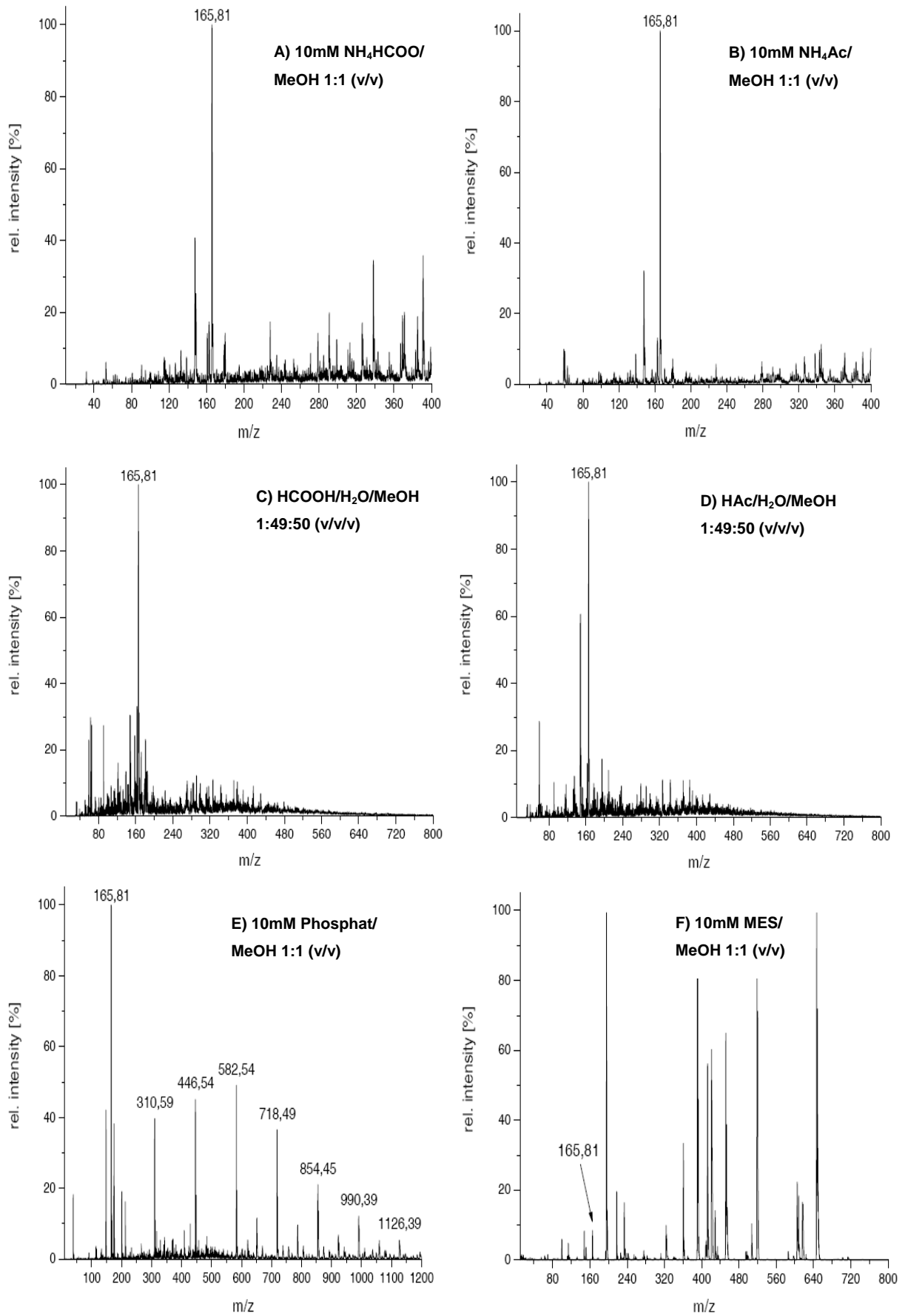


Abb. 32 Einfluss verschiedener Elektrolyte auf die Detektierbarkeit von Ephedrin $[M+H]^+ = 165,81$
(Nanoelektrospray-Massenspektrometrie mit Proxeon-Nadeln, $U=0,7-1,1kV$)

Phosphate und MES sind als Elektrolyten für die MS-Detektion untauglich, da sie im Spektrum eine starke Clusterbildung (Abb. 32E - 136 m/z für KH_2PO_4) oder extreme Störsignale (Abb. 32F) verursachen und somit mit Analytsignalen überlappen können. Dies gilt auch für rein wässrige Phosphat-Elektrolyte und MES/MeOH bei geringeren Konzentrationen (ab 1mM - MS-Daten nicht aufgeführt). Im Gegensatz dazu weisen Ammoniumformiat/ NH_4HCOO (Abb. 32A), Ammoniumacetat/ NH_4Ac (Abb. 32B), Ameisensäure/ HCOOH (Abb. 32C) und Essigsäure/ HAc (Abb. 32D) gute MS-Kompatibilitäten auf und sind deshalb für die CE/MCE-MS Kopplung geeignet. Zur genaueren Beurteilung des Elektrolyteinflusses auf die MS-Detektierbarkeit von $1\mu\text{g/mL}$ Ephedrin sind in Abhängigkeit von den verwendeten Konzentrationen in Tab. die Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N) zusammengefasst. Aus „massenspektrometrischer Sicht“ werden für $\text{NH}_4\text{HCOO}/\text{NH}_4\text{Ac}$ Ionenkonzentrationen zwischen 1-10 mM und für HCOOH/HAc Volumenkonzentrationen zwischen 0,1-1% vorgeschlagen, da in diesem Bereich maximale S/N-Verhältnisse ermittelt wurden. Von höheren Ionenkonzentrationen sollte aufgrund der Ionensuppression des Elektrolyten abgesehen werden, da sich die S/N-Verhältnisse zu stark verschlechtern.

Tab. 6 Signal-Rausch-Verhältnisse für $1\mu\text{g/mL}$ Ephedrin in Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration

<i>c</i> [mM]	<i>Salze</i>		<i>Vol%</i>	<i>Säuren</i>	
	$\text{NH}_4\text{HCOO}/$ 50%MeOH	$\text{NH}_4\text{Ac}/$ 50%MeOH		$\text{HCOOH}/$ 50%MeOH	$\text{HAc}/$ 50%MeOH
1	147	111	0,1	57	67
10	51	116	1	30	83
100	7	17	10	25	28

Generell gilt für die MS-Detektion, dass alle im Elektrolyten gelösten Bestandteile (flüchtige und nicht flüchtige) die Ionisierungseffizienz der Analyten verringern (Ionensuppression)²⁵¹. Je mehr Ionen in der Lösung vorliegen, desto unwahrscheinlicher ist die Ionisation eines Analytmoleküls (Freisetzung als Gasphasenion aus flüssiger Phase). Auf der anderen Seite sind Elektrolyte für die Elektrophorese unerlässlich und beeinflussen über ihre Acidität den pH-Wert in der Lösung und damit den Ladungszustand der Analyten. Wie demonstriert, sollte deshalb vor der Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie (MCE-MS) mittels Nanoelektrospray-Massenspektrometrie (nanoES-MS) die MS-Kompatibilität der verwendeten Elektrolyten und ihr Einfluss auf die Detektierbarkeit der Analyten (Bestimmung der S/N-Verhältnisse) untersucht werden. Außerdem ist die vorherige Trennungsoptimierung in der Kapillarelektrophorese (CE) sehr wertvoll. Aus nanoES-Experimenten und CE-Trennungen lassen sich optimale Elektrolytzusammensetzungen ableiten und auf die MCE-MS-Kopplung übertragen.

4.2.2 Sprayperformance des monolithisch integrierten Emitters

Aus der wissenschaftlichen Beschreibung des Nanoelektrosprays nach Wilm und Mann (S. 26-28) ist die zentrale Bedeutung des Emitterradius auf den Sprayprozess (Durchbruchspannung und Flussrate) deutlich geworden. Zur Berechnung der elektrischen Feldstärke an der Kapillarspitze kann nach Pfeifer und Hendricks¹⁴⁴ folgende Gleichung herangezogen werden.

Gl. 7

$$E_c = \frac{2V_c}{r_c \cdot \ln(4d/r_c)}$$

V_c = Potentialdifferenz Spitze/Gegenelektrode
 r_c = Außenradius der Spitze
 d = Abstand der Kapillare/Gegenelektrode

Demnach hat der Emitterradius r_c gegenüber dem Abstand Spitze/Gegenelektrode den größeren Einfluss auf die elektrische Feldstärke. Die notwendige Potentialdifferenz zur Initiierung eines stabilen Elektrosprayprozesses kann über Gleichsetzen mit dem Schwellwert des Taylor-Konus (Gl. 4 - S. 23) aus Emitterradius, Abstand Kapillare-Gegenelektrode und Oberflächenspannung der Lösung ermittelt werden. Aufgrund dieses Zusammenhanges wird ersichtlich, warum bei veränderten Emitterdurchmessern die angelegte Spannung angepasst werden muss. Neben dem theoretischen Verständnis ist die Untersuchung der Sprayperformance (Signalintensität, Signalstabilität und Signal/Rausch-Verhältnis) in Abhängigkeit vom gewählten Emitterradius zentrales Anliegen dieser Arbeit²⁵². Zu diesem Zweck wurden vergleichende Nanoelektrospray Experimente zwischen monolithischen Emitterchips und kommerziellen Nanospray-Nadeln (Proxeon) durchgeführt. Abb. 33 zeigt beide Emitter-Typen für die MS-Detektion.

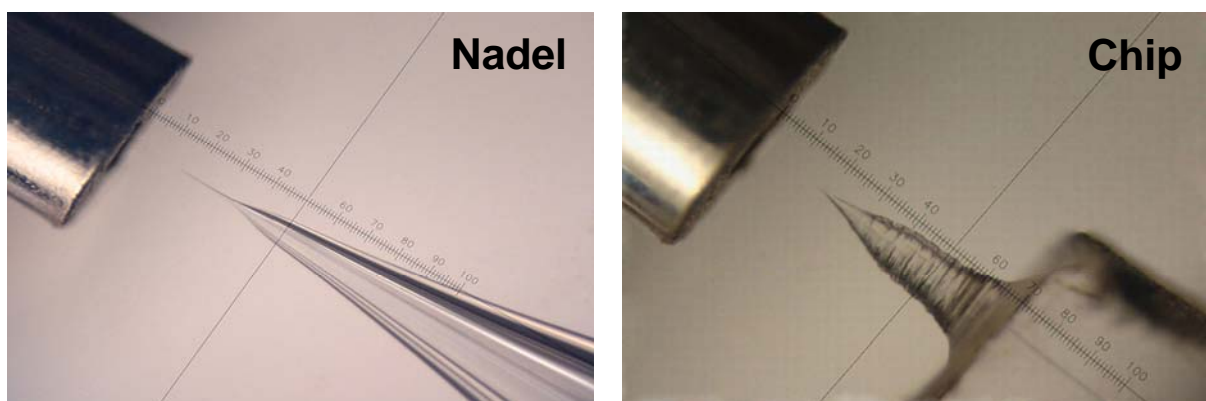


Abb. 33 Nanospray-Nadel (Proxeon) und monolithischer Emitterchip (Abstand zum MS-Eingang $d = 0,5$ mm)

Abb. 34 zeigt den Vergleich der Signalintensität von Ephedrin, gemessen als Molekülionenstrom (*Molecule Ion Current*), für Nanospray-Nadeln und Emitterchips in Abhängigkeit vom Emitterdurchmesser in einem Bereich zwischen 1 - 20 μm . Bei konstantem Ionisationspotential (1 kV) wurde zur Bestimmung der Standardabweichung die Messung der Datenpunkte 6fach durchgeführt ($n=6$). Zwar unterscheiden sich die gemessenen Signalintensitäten aufgrund der abweichenden Emitterdurchmesser, trotzdem wird für beide Emittertypen der identische Signalverlauf mit einem Intensitätsmaximum bei einem Durchmesser von 10 μm beobachtet (Emitterdurchmesser der Nanospray-Nadel: 10 μm / Emitterchip: 8 μm).

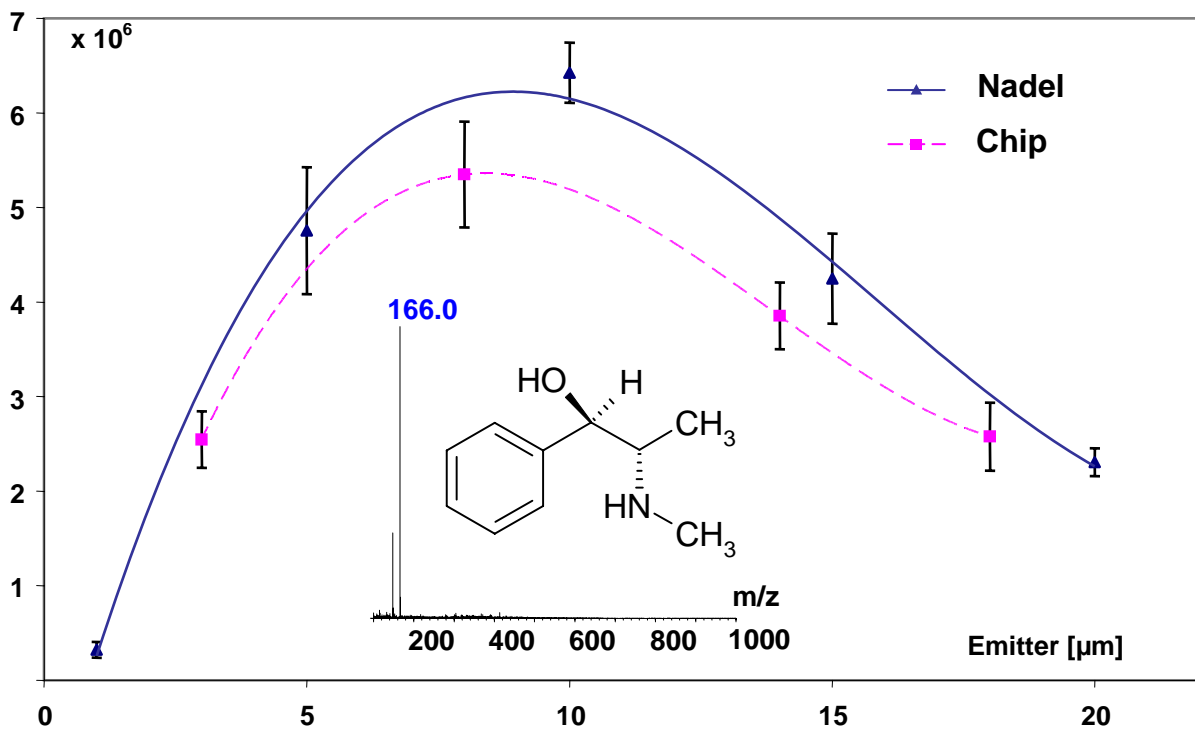


Abb. 34 Nanospray-Nadel vs. Emitterchip - Signalintensität von $1\mu\text{g/mL}$ Ephedrin in MeOH/H₂O 1:1 (v/v) in Abhängigkeit des Emitterdurchmessers (Abb. aus Diplomarbeit von M. Eschner 2007 / Universität Regensburg)

Im Vergleich zum optimalen Emitterdurchmesser von 10 μm führen sowohl geringere als auch größere Dimensionen zu einer deutlichen Verringerung der Signalintensität. Ausgehend von der Nanoelektrospray-Theorie wird der Kurvenverlauf folgendermaßen interpretiert. Aufgrund der direkten Proportionalität zwischen Emitterdurchmesser und Tröpfchengröße müssen bei größeren Durchmessern mehr Lösemittelmoleküle verdampfen, damit der gleiche Betrag an Analytmolekülen ionisiert werden kann. Im Ergebnis sinkt die Ionisierungseffizienz während des Elektrosprayprozesses ab. Auf der anderen Seite entspricht die Reduzierung des Durchmessers einer Verringerung der Flussrate, weniger Analytmoleküle verlassen den Emitter, werden ionisiert und im Massenspektrometer detektiert, was ebenso eine geringere Signalintensität nach sich zieht.

Um die enge Verwandtschaft zwischen Nanospray-Nadel und Emitterchip zu bestätigen, wurden nach den Messungen mit Ephedrin zusätzlich vergleichende Experimente mit zwei weiteren Testsubstanzen, Leucin-Enkephalin (10 µg/mL - 18 µmol/L) and Ubiquitin (10 µg/mL - 1,2 µmol/L) durchgeführt. Dabei erfolgte zur Unterdrückung der Wandabsorption vor dem Messen ein zusätzlicher Spülschritt mit 0,05%iger-HPMC Lösung in MeOH/H₂O 1:1 (v/v). Außerdem wurde den Analyten zur Verbesserung der Ionisierungseffizienz Essigsäure (0,1 Vol% für Leucin-Enkephalin und 1 Vol% für Ubiquitin) zugesetzt. Alle MS-Experimente (n=6) wurden unter Verwendung des optimalen Emitterdurchmessers von 10 µm bei 1,2-1,4 kV angelegter Elektrosprayspannung durchgeführt und sind in Tab. 7 zusammengefasst. Analog zu Ephedrin können auch bei MS-Detektion von Leucin-Enkephalin und Ubiquitin nahezu identische Werte für Signalintensitäten, Signalstabilitäten und Signal/Rausch-Verhältnisse beobachtet werden. Dies gilt für beide Emittertypen, Nanospray-Nadel und Emitterchip und ist begründet im gemeinsamen Wirkungsprinzip - Nanoelektrospray.

Tab. 7 Sprayperformance von Nanospray-Nadel vs. Emitterchip (i.d.= 10 µm) für Leucin-Enkephalin und Ubiquitin

	Leucin-Enkephalin [M+H] ⁺ = 556.3		Ubiquitin [M+12H] ¹²⁺ = 714.8	
	Nanospray-Nadel	Emitterchip	Nanospray-Nadel	Emitterchip
Signalintensität [x10 ⁶ counts/s]	2,92	3,08 (+5%)	6,89	6,71 (-3%)
rel. Standard- abweichung [%]	9	7	14	11
Signal/Rausch- Verhältnis (S/N)	285	300	148	138

Obwohl hier der Vergleich der Sprayperformance zwischen Nanospray-Nadel und Emitterchip im Mittelpunkt steht, würden die ermittelten Signal/Rausch-Verhältnisse bis zum Erreichen der Nachweisgrenze (*Limit of Detection*) noch deutlich geringere Analyt-Konzentrationen zulassen. Auf der anderen Seite wird die Nachweisgrenze der MS-Detektion entscheidend durch die Systemparameter der verwendeten Massenspektrometern bestimmt. Durch den Einsatz von modernen Systemen wie Triple-Quadrupol (Q-Q-Q), Quadrupole-Time of Flight (Q-Q-ToF) oder Tandem-Time of Flight (ToF-ToF) Geräten anstatt des hier verwendeten Single-Quadrupol-Massenspektrometers, könnte die Nachweisgrenze um Größenordnungen verringert werden. Außerdem bieten diese modernen Hybridsysteme einen enormen Zuwachs an Auflösung und Massengenauigkeit, der sie für den Einsatz in der Bioanalytik prädestiniert.

Abgebrochene vs. geätzte Spitze

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Mikrokanäle nach dem Verfahrensschritt „Spitze ziehen“ durch nicht reproduzierbares Abbrechen der Emitterspitze geöffnet und somit für die Chip-MS-Detektion zugänglich. Jetzt beinhaltet der Fabrikationsprozess neben dem CNC-Fräsen und Spitze ziehen zusätzlich das Ätzen mit Flusssäure. Dadurch können definierte Emittergeometrien mit sich verjüngenden Mikrokanälen reproduzierbar hergestellt werden. Die drastisch reduzierte Wandstärke führt zu einer sehr kleinen Emitterfläche, so dass Totvolumen praktisch vermieden wird (S. 52 - 4.1.1). Zur experimentellen Überprüfung wurde mit beiden Emittertypen gemessen. Wie Abb. 35 aufzeigt, wirkt sich die verbesserte Prozedur bei der Emittorfertigung (Ätzen mit Flusssäure) positiv auf die MS-Detektion von $1\mu\text{g/mL}$ Ephedrin in MeOH/H₂O 1:1 (v:v) aus. Der Vergleich beider Emittertypen (schematische Darstellung) liefert für Ephedrin bei identischen Innendurchmessern von $10\mu\text{m}$ für die geätzte Spitze im MS-Spektrum eine 7fach höhere Signalintensität gegenüber der abgebrochenen Spitze, während die Signalstabilität des Totalionenstromes (TIC) keine signifikanten Unterschiede aufweist.

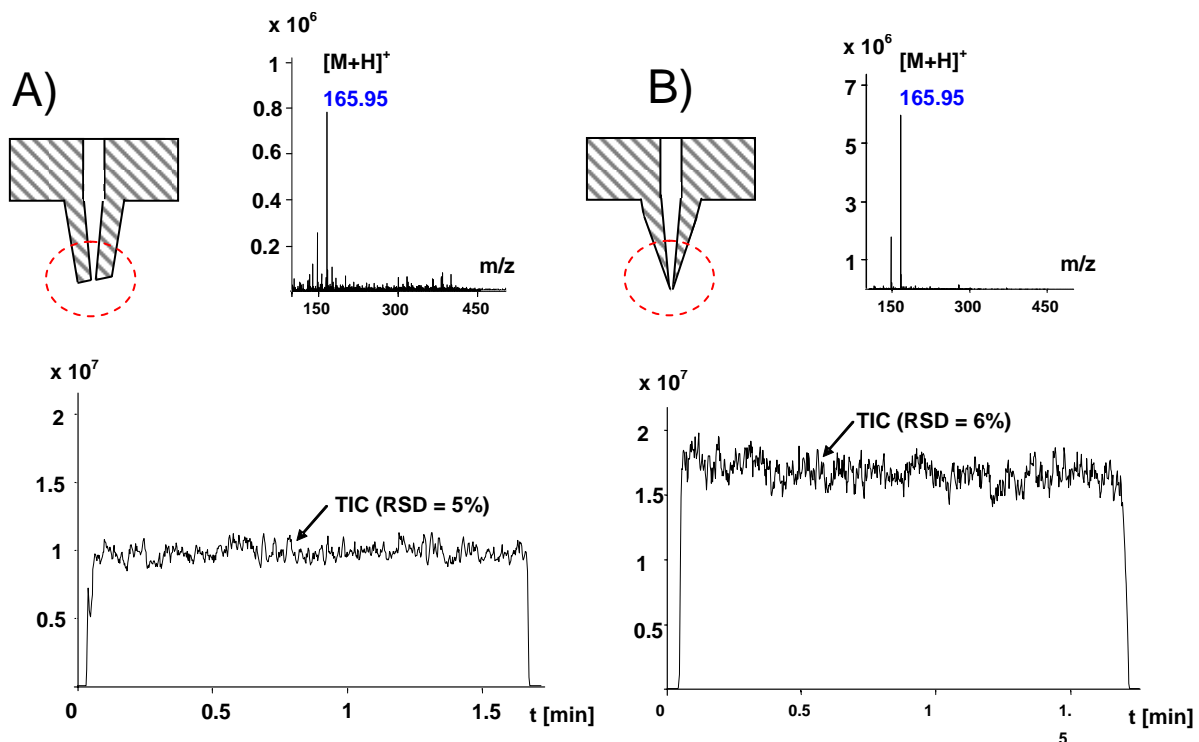


Abb. 35 Vergleich TIC [counts/s] und extrahiertes Massenspektrum von $1\mu\text{g/mL}$ Ephedrin in MeOH/H₂O 1:1 (v/v) (elektrische Kontaktierung für MS-Detektion mit $U=1,1\text{kV}$ über BI-Vial)

- A) abgebrochene Spitze
- B) geätzte Spitze (beide mit Innendurchmesser $d = 10\mu\text{m}$)

Elektrische Kontaktierung

Neben den Ansätzen „serielles Layout“ und „Make-Up Flow Layout“ wurden in dieser Arbeit Gold und Polyanilin (PANI) als leitfähige Beschichtungen des Emitters auf ihre Eignung hin untersucht. Voraussetzung für den praktikablen Einsatz ist die Langlebigkeit der leitfähigen Beschichtung, die die mehrfache Verwendbarkeit des Emitterchips für die Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie gewährleisten soll. Bei der MS-Detektion mit PANI als leitfähiger Beschichtung ist nur in der 1. Messung das Signal von Ephedrin als Testsubstanz nachweisbar (Daten nicht gezeigt) und wie bereits in Abb. 30 auf S. 53 dargestellt, sind ab der 3. Messung am Emitter deutlich Abriebspuren erkennbar, die auf eine Unterbrechung der Leitfähigkeit hinweisen. Abb. 36 zeigt den Signalverlauf (TIC) des Chip-MS-Experiments mit Gold als leitfähiger Beschichtung. Während in der Referenzmessung bei Kontaktierung über den Trennkanal (Spannung an BI-Vial) und in der 1. Messung mit direkter Emitter-Kontaktierung konstante Signalintensitäten beobachtet werden, ist die 2. Messung zu Beginn durch eine 25%-ige Verringerung der Signalintensität bis hin zum kompletten Signalabbruch gekennzeichnet.

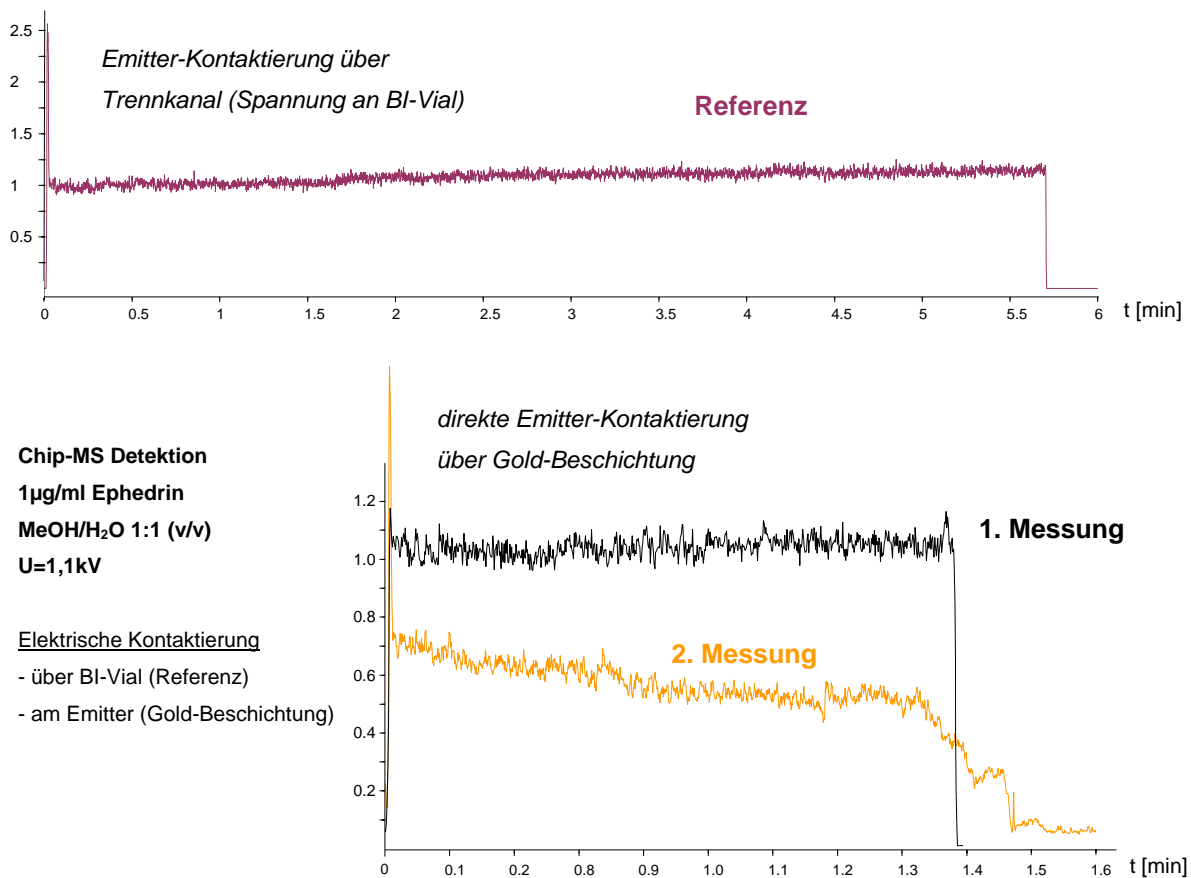


Abb. 36 Totalionenstrom ($\times 10^6$) bei elektrischer Kontaktierung über BI-Vial (Referenz) oder direkt am Emitter

4.2.3 Chip-MS Detektion

Nach umfangreicher Charakterisierung der Sprayperformance des Chip-Emitters im Vergleich zu konventionellen Nanospray-Nadeln wurde die Chip-MS-Kopplung zur massenspektrometrischen Detektion einiger biochemisch relevanter Standardsubstanzen eingesetzt. Dabei steht nicht die Untersuchung von Nachweisgrenzen sondern die prinzipielle Verwendbarkeit der Technik im Vordergrund. Am Anfang stehen Gramin, Yohimbin (Aphrodisiakum) und Reserpin aus der Stoffklasse der Indolalkaloide. Daneben konnten die Pharmazeutika Primaquin (Mittel gegen Malaria) und die Antibiotika Ciprofloxacin und Sparfloxacin (Gyrase-Hemmer) erfolgreich detektiert werden. Abb. 37 zeigt chemische Struktur und MS-Spektren dieser Substanzen.

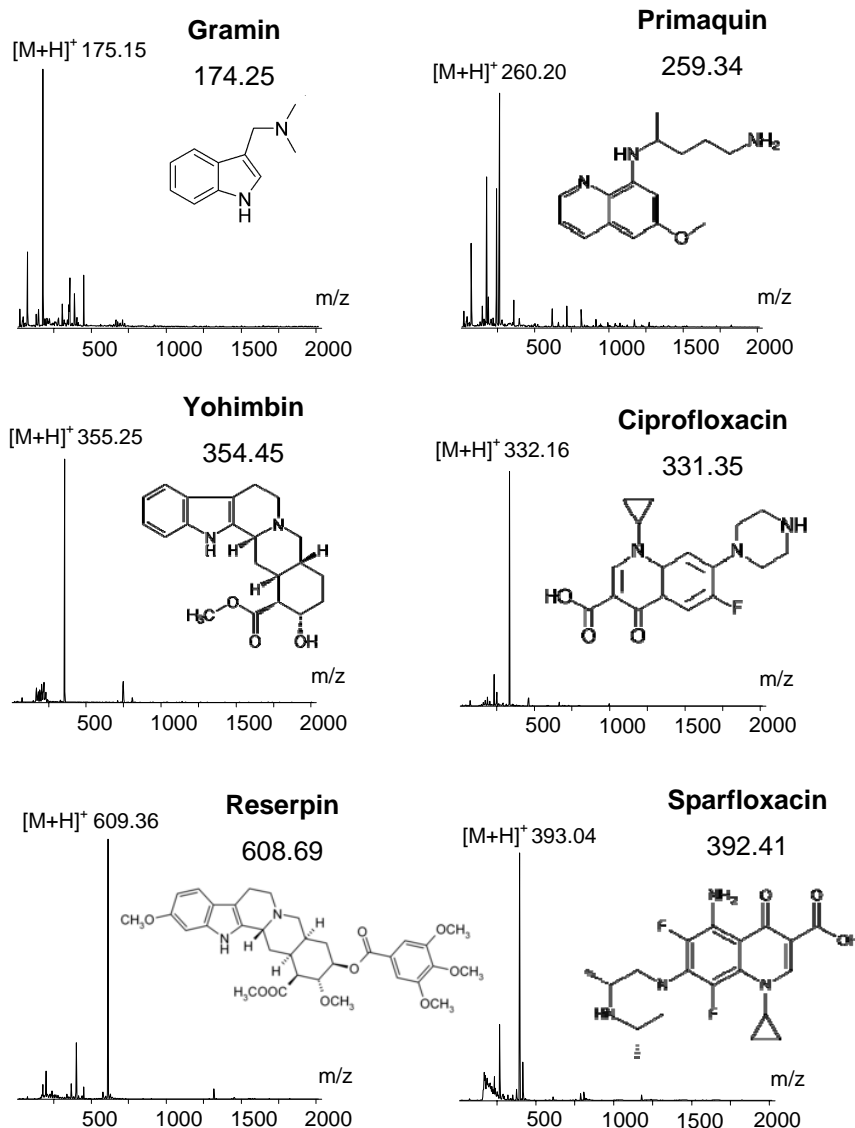


Abb. 37 Chip-MS Detektion von Alkaloiden und Pharmazeutika mit Time of Flight -Massenspektrometer 100 µg/mL je Analyt in 0,1 Vol% Essigsäure mit 25 Vol % MeOH / BI-Spannung 1 kV (Serielles Layout)

Die ebenfalls mittels Chip-MS-Kopplung detektierten Peptide sind bekannte Standardsubstanzen und in der Bioanalytik weit verbreitet. Wie die MS-Spektren in Abb. 38 bestätigen, konnten Angiotensin I, Gramacidin D, Physalaemin, Substanz P, Bradykinin und Eledoisin nachgewiesen werden, wobei neben den einfach geladenen auch zweifach geladene Molekülionen detektiert werden. Dieses Phänomen ist bei Peptiden häufig zu beobachten und durch das Vorhandensein leicht protonierbarer Gruppen in den Aminosäureresten von Arginin, Lysin und Histidin begründet. Aus der Reihe der Peptide wurden das blutdrucksenkende Bradykinin und das Antibiotikum Gramacidin (zugeordnet wird Gramacidin D) für ultraschnelle Analysen in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie ausgewählt (S. 97).

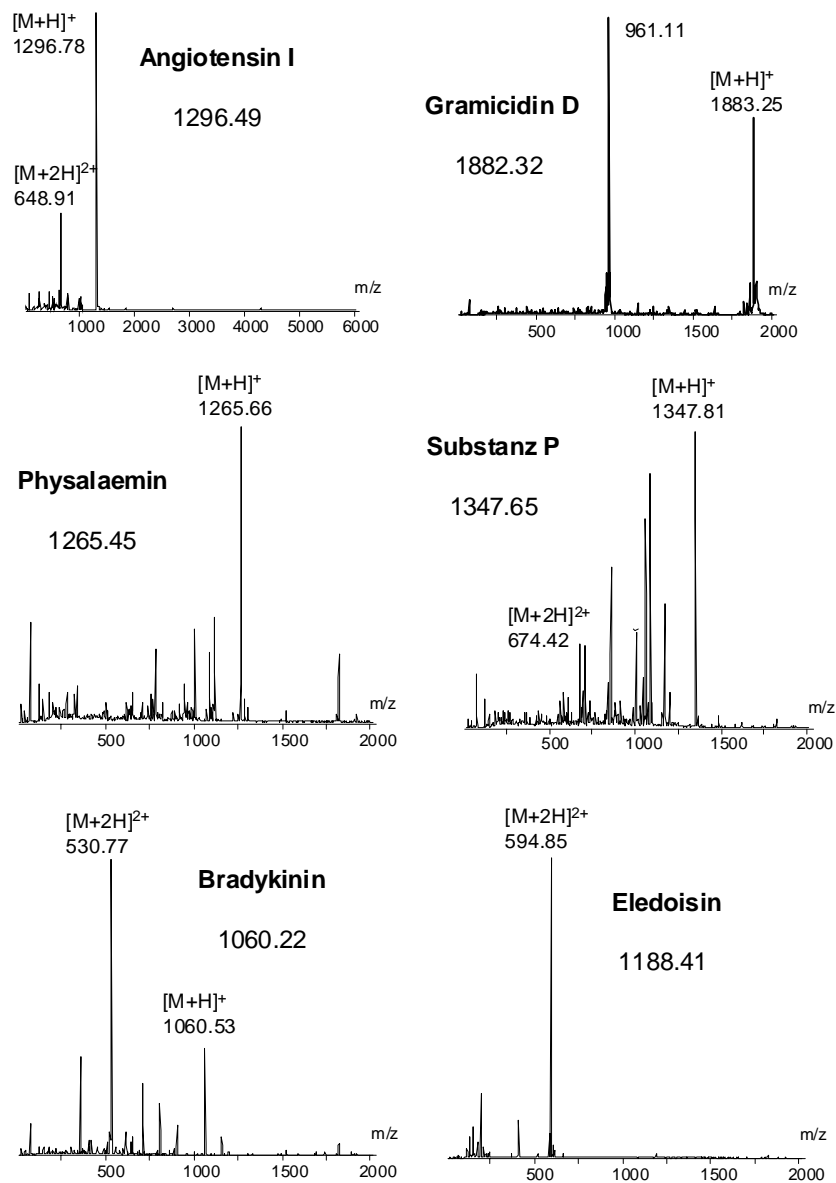


Abb. 38 Chip-MS Detektion von Peptiden mit Time of Flight -Massenspektrometer

100 µg/mL je Analyt in 0,1 Vol% Essigsäure mit 25 Vol % MeOH / BI-Spannung 1 kV (Serielles Layout)

4.3 Mikrochipelektrophorese - Massenspektrometrie

Die Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie (MCE-MS) stellt die miniaturisierte Variante der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS) dar, weshalb grundsätzliche Erwägungen von der CE-MS auf die MCE-MS übertragen werden dürfen.

Beide Techniken sind durch Flussraten im nL/min-Bereich gekennzeichnet, was die Kopplung mit der Massenspektrometrie erleichtern sollte. Die elektrische Kontaktierung des Emitters zur Definition der Elektrosprayspannung wird dabei vorausgesetzt.

In der Kapillarelektrophorese ist der Einsatz von phosphat- und borathaltigen Puffersystemen weit verbreitet. Wie bereits bekannt und in dieser Arbeit für phosphathaltige Elektrolyte mittels Nanoelektrospray-Massenspektrometrie gezeigt werden konnte, sind diese Substanzen für die MS-Detektion jedoch ungeeignet, weil sie durch ihre Clusterbildung starke Störsignale im MS-Spektrum verursachen. Ursache ist die mangelnde Flüchtigkeit dieser Lösungen, die man vereinfachend als Verdunstungsverhalten interpretieren aber wegen der Abhängigkeit gegenüber vielen physikalischen Größen theoretisch kaum vorhersagen kann²⁵³.

Da die Flüchtigkeit etablierter Kapillarelektrophorese-Puffer nicht gegeben ist, muss für eine aussagekräftige MS-Detektion auf leichter flüchtige Puffer und Elektrolyte zurückgegriffen werden. Hier haben sich insbesondere Essigsäure und Ammoniumacetat bewährt. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der Einfluss der Elektrolytkonzentration auf die MS-Detektion der Analyten, der auch als Ionensuppression bezeichnet wird.

Mit Hilfe der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass zu hohe Elektrolytkonzentrationen sowohl stärkeres Untergrundrauschen als auch die Verringerung der Analyt-Signalintensitäten verursachen. In der Folge nimmt die Nachweisempfindlichkeit der MS-Detektion, gemessen als Signal-Rausch-Verhältnis, stark ab.

Insgesamt betrachtet muss bei der Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie die Anpassung der Elektrolytkonzentration und Zusammensetzung als Kompromiss zwischen den speziellen Anforderungen der Mikrochipelektrophorese und der Massenspektrometrie betrachtet und dementsprechend optimiert werden.

4.3.1 Testgemische

Am Anfang der experimentellen Untersuchungen wurde mit Hilfe von Ephedrin die Sprayperformance des monolithisch integrierten Emitters evaluiert. Außerdem konnte die Chip-MS-Kopplung erfolgreich für die massenspektrometrische Detektion von Standardsubstanzen eingesetzt werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht jedoch die Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie zur Auftrennung und Detektion von Analyten. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Testgemische eingeführt.

Das erste Testgemisch besteht aus Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid, deren chemische Strukturen und Massenspektren in Abb. 39 dargestellt sind. Die Pharmazeutika Amilorid, Bendroflumethiazid, Bumetanid gehören zur Gruppe der Diuretika und fördern die Harn-Ausscheidung (Diurese). Bei Leucin-Enkephalin handelt es sich um ein endogenes Pentapeptid (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) aus der Klasse der Opioid-Peptide. Es wurde aus dem Gehirn isoliert, besetzt die gleichen Rezeptoren wie Morphin und seine Derivate (Opiate) und beeinflusst die Gesamtaktivität des Gehirns²⁵⁴.

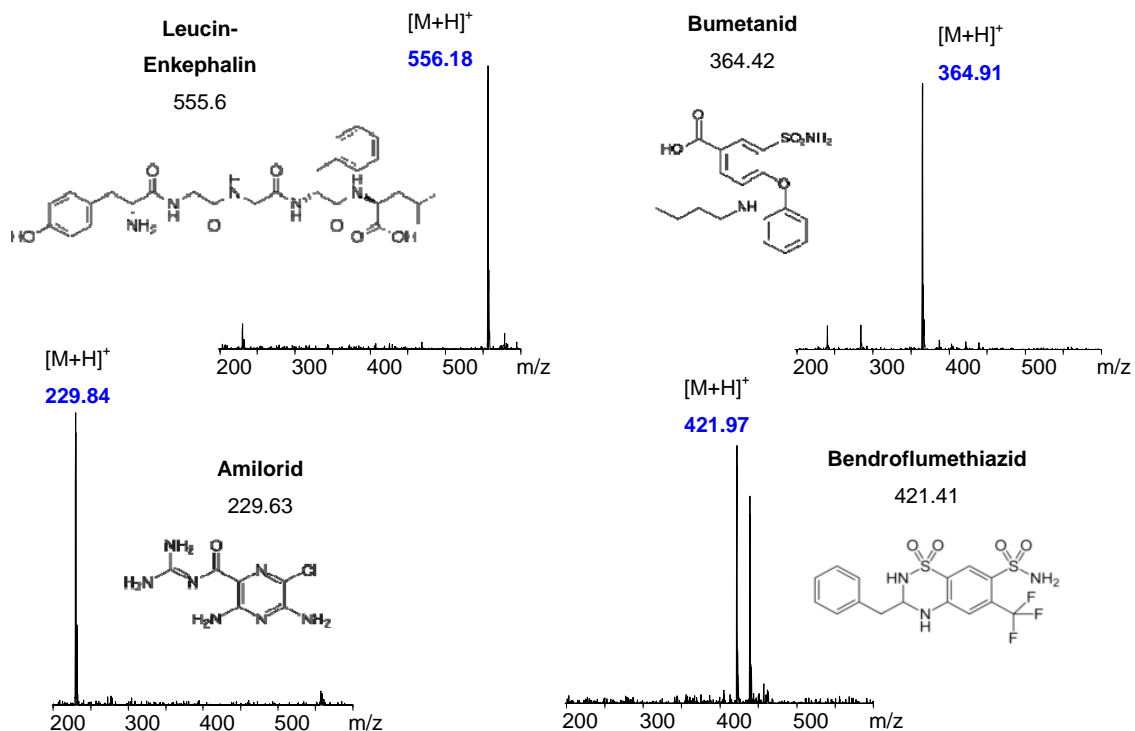


Abb. 39 Chemische Strukturen und Massenspektren von Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid als Testgemisch für die Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie
100 µg/mL je Analyt in 0,1 Vol% Essigsäure mit 25 Vol % MeOH / BI-Spannung 1 kV (Serielles Layout)

Das zweite Testgemisch zur Etablierung der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie besteht aus Spermin, Arginin und Nicotinamid. Abb. 40 beinhaltet die chemischen Strukturen und dazugehörige Massenspektren dieser Substanzen.

Das biogene Polyamin Spermin ist Bestandteil des menschlichen Spermas und tritt in Zellen schnell wachsender Gewebe auf. Es kann unter den gegebenen Bedingungen als einfach und zweifach geladenes Molekülion detektiert werden.

Im sauren Essigsäureelektrolyten gelöst, tritt die proteinogene Aminosäure Arginin durch Protonierung der Guanidinogruppe ebenfalls als zweifachgeladenes Molekülion auf. Die massenspektrometrische Detektion ist in diesem Fall jedoch nicht möglich, weil der gewählte Massenbereich zwischen 100 und 500 m/z liegt.

Nicotinamid hat als Baustein des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) und des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP) große biochemische Bedeutung. Zusammen mit Nicotinsäure ist Nicotinamid als Niacin außerdem Bestandteil des Vitamin-B-Komplexes.

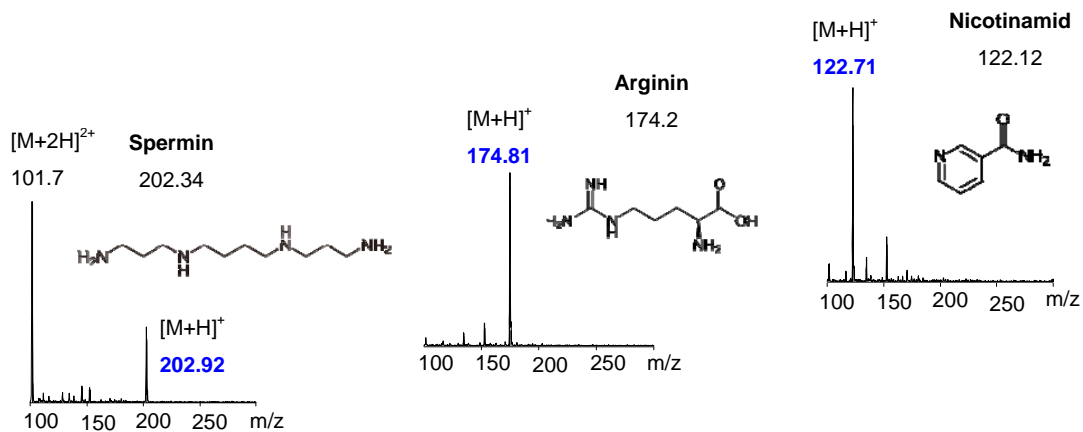


Abb. 40 Chemische Struktur und Massenspektren von Spermin, Arginin und Nicotinamid als Testgemisch für die Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ je Analyt in 0,1 Vol% Essigsäure mit 25 Vol % MeOH / BI-Spannung 1 kV (Serielles Layout)

4.3.2 Trennungsoptimierung

Die Trennungsoptimierung in der Kapillarelektrophorese und Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE/CE-MS) steht vor der Analyse in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (MCE-MS). Um eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen in der MCE-MS zu gewährleisten, sind konstante Oberflächeneigenschaften der mikrofluidischen Trennkanäle notwendig, die jedoch zeitaufwendige Spülschritte erforderlich machen. Hier gestatten die gute Handhabbarkeit der CE-MS-Kopplung und der hohe Automatisierungsgrad des CE-Gerätes die deutliche Steigerung des Messdurchsatzes. Außerdem können durch diese Maßnahme wertvolle Mikrochips und begrenzte Herstellungskapazitäten bei der Emitterfertigung geschont werden. Ziel ist es, maximale Trenneffizienzen und Auflösungen schon von vornherein in der MCE-MS zu ermöglichen. Aus der Vielzahl der Parameter zur Trennungsoptimierung in der Kapillarelektrophorese nach Engelhardt²⁵⁵ (Abb. 41) wurden im Rahmen dieser Arbeit Spannung, Elektrolytkonzentration, Viskosität und Kapillarwand-Beschichtungen ausgewählt. Ihr Einfluss auf die Trenneffizienz und Auflösung der untersuchten Testgemische wird im Text diskutiert.

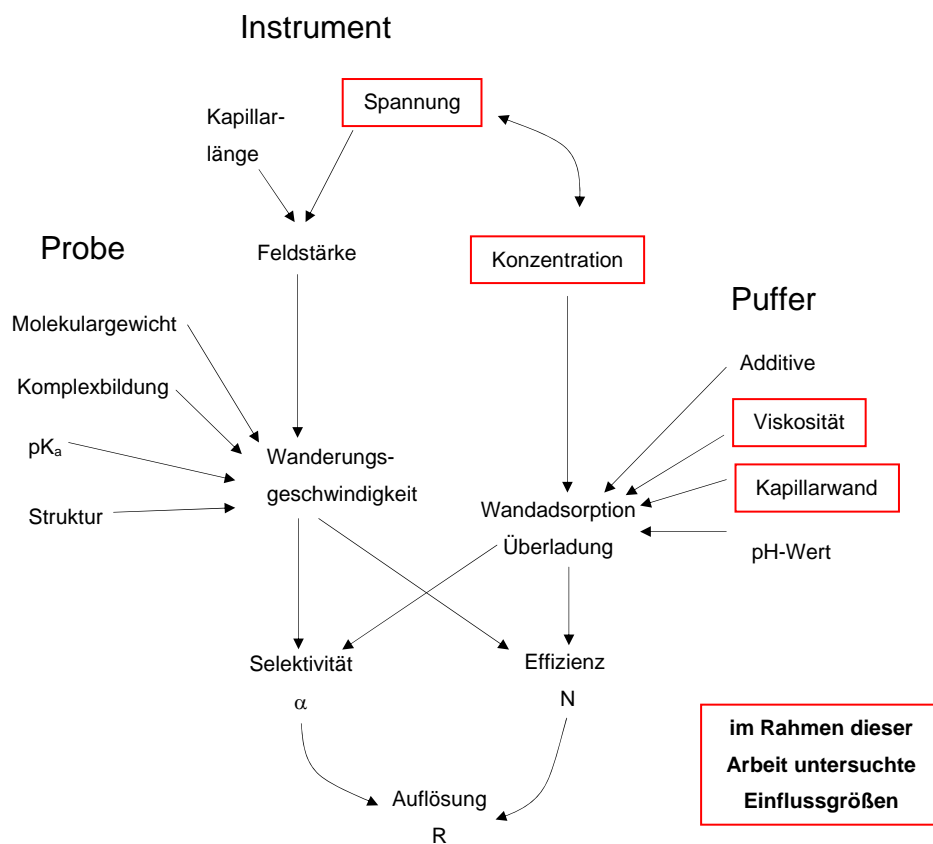


Abb. 41 Parameter zur Trennungsoptimierung in der Kapillarelektrophorese die Modifikationen des Instruments, des Trennpuffers und Stoffeigenschaften der Probe entsprechen - nach H. Engelhardt „Kapillarelektrophorese“²⁵⁵

Essigsäure-Konzentration

Am Anfang der Trennungsoptimierung in der Kapillarelektrophorese wird der Einfluss der Elektrolytkonzentration auf die Trenneffizienz untersucht. Vergleichende Elektropherogramme unter Verwendung zweier Essigsäure-Konzentrationen (0,1- und 1 Vol% HAc mit 25 Vol% MeOH) sind in Abb. 42 gegenübergestellt.

Während beide Elektrolyten Basislinientrennungen ermöglichen, liefert die höhere Essigsäure-Konzentration mit Ausnahme des Bumetanidpeaks deutlich höhere Trennstufenzahlen (N). Hintergrund ist der Einfluss der Elektrolytkonzentration auf die Ausbildung der Doppelschicht an der Phasengrenzfläche zwischen Kapillarwand und Lösung. Hohe Elektrolytkonzentrationen schirmen die Silanolgruppen an der Innenwand effektiv ab, in der Folge nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses ab. Die Steigerung der Trenneffizienz bei hohen Ionenkonzentrationen lässt sich außerdem durch reduzierte Analyt-Wand-Wechselwirkungen aufgrund besser abgeschirmter Analytionen erklären. Ausgehend von der Trenneffizienz scheinen hohe Ionenkonzentrationen zur Übertragung auf die Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie empfehlenswert. Gleichzeitig muss ihr Einfluss auf die MS-Detektion als Ionensuppression und die Systemstabilität (Leitfähigkeit) berücksichtigt werden.

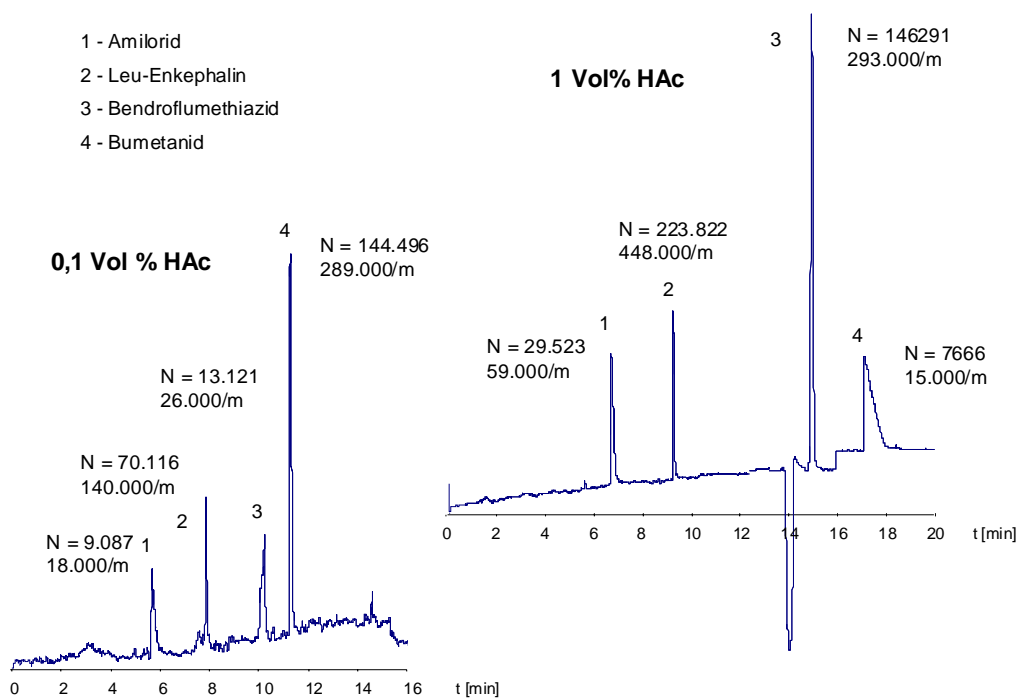


Abb. 42 Kapillarelektrophorese ($E = 333 \text{ V/cm}$) mit 25 Vol% MeOH unter Verwendung unterschiedlicher Essigsäure-Konzentrationen (Dokumentation der Versuchsbedingungen - Experimenteller Teil S. 48)

MeOH-Anteil

Alternativ zur Ionenkonzentration bietet die Variation von MeOH als organischem Anteil eine weitere Möglichkeit zur Manipulation der Trennleistung. Sie basiert auf dem komplexen Zusammenspiel veränderter Selektivität, elektroosmotischer Wanderungsgeschwindigkeit und unterschiedlichen Viskositäten der verwendeten Elektrolyten²⁵⁵. Abb. 43 zeigt eine Messreihe von Basislinientrennungen von Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid in 0,1%-iger Essigsäure-Lösung mit variablem MeOH-Anteil zwischen 0-50 Vol%.

Demnach sind die Migrationszeiten der Analyten direkt proportional zur Höhe des MeOH-Anteils. Zwar verursachen MeOH-Anteile von 12,5 Vol% und 50 Vol% für Leu-Enkephalin deutlich höhere Trennstufenzahlen (N), der 25 Vol% Elektrolyt bietet jedoch die höchste Auflösung zur Auftrennung von Bendroflumethazid und Bumetanid, weshalb dieser Elektrolyt bevorzugt wird und als Standardelektrolyt in dieser Arbeit oft Verwendung findet.

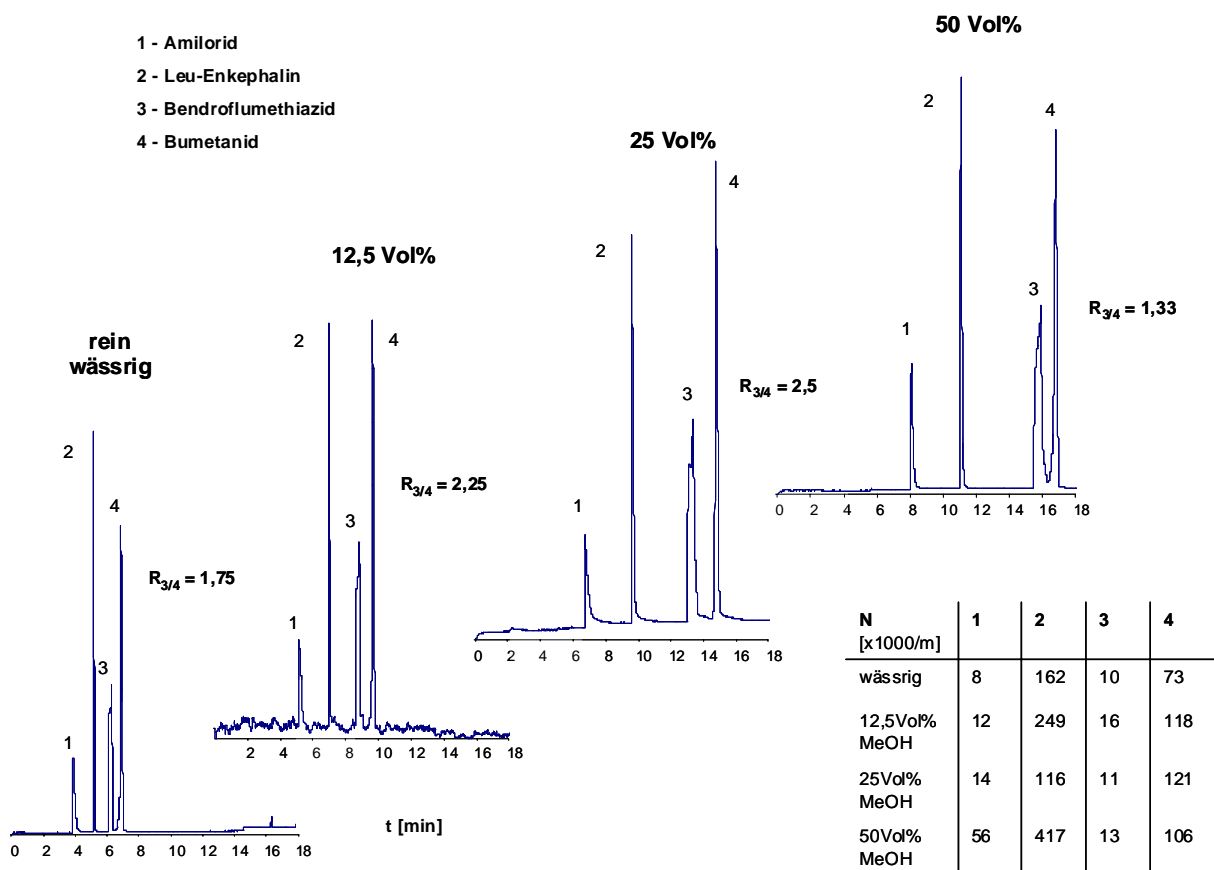


Abb. 43 Kapillarelektrophorese ($E = 333 \text{ V/cm}$) mit 0,1 Vol%-Essigsäure unter Verwendung variabler MeOH-Anteile (andere Kapillare als in Abb. 42 / Dokumentation der Versuchsbedingungen - Experimenteller Teil S. 48)

Ammoniumacetat

Als Alternative zu den weit verbreiteten Essigsäure-Elektrolyten wurde auch die Trennleistung von Ammoniumacetat-Lösungen (1- 10- und 100 mM) in der Kapillarelektrophorese untersucht. Konzentrationen von 1- und 100 mM erscheinen auf Grund mangelnder Reproduzierbarkeit als ungeeignet. Die Analyse in 10 mM Ammoniumacetat-Lösungen mit Acetonitril oder Methanol als organischem Anteil lieferte hingegen gute Ergebnisse. Sie sind in Abb. 44 zusammengefasst. Mit allen Zusammensetzungen des Ammoniumacetat-Elektrolyten können Basislinientrennungen von Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid erzielt werden. Dabei zeichnet sich der Elektrolyt mit dem 25 Vol% MeOH-Anteil durch die höchsten Trennstufenzahlen (N) aus. Er wird deshalb zur Übertragung auf die Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie favorisiert. Außerdem wurden im Rahmen der Trennungsoptimierung in der Kapillarelektrophorese auch Experimente mit MS-kompatiblen Ameisensäure- und Ammoniumformiat-Elektrolyten durchgeführt. Gegenüber Essigsäure und Ammoniumacetat weisen sie jedoch eine geringere Trennleistung auf und werden deshalb hier nicht mit aufgeführt.

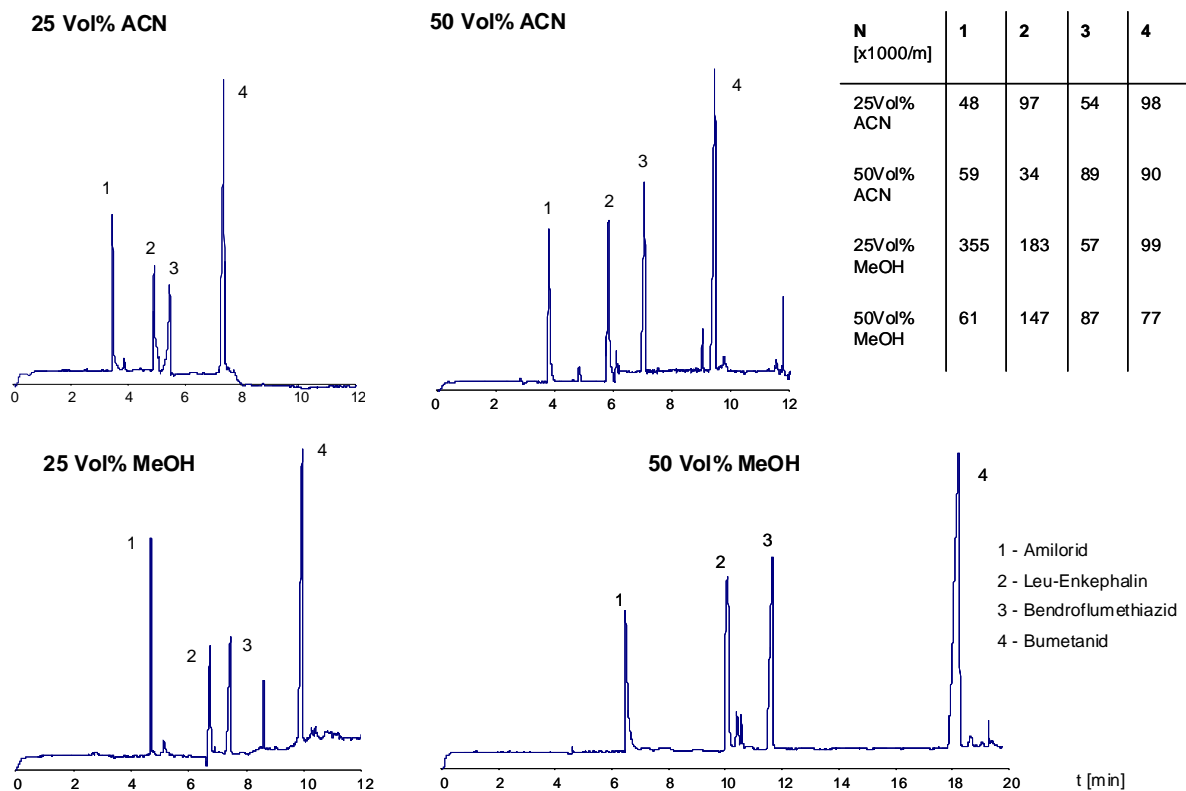


Abb. 44 Kapillarelektrophorese ($E = 333 \text{ V/cm}$) mit 10mM Ammoniumacetat und Acetonitril (ACN) oder Methanol (MeOH) als organischem Anteil (Dokumentation der Versuchsbedingungen - Experimenteller Teil S. 48)

Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie

Für die Trennungsoptimierung in der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS) wird die robuste *sheathflow*-Konfiguration mittels Sprayer verwendet (S. 48). Dabei wird über eine externe Spritzenpumpe am Sprayer eine leitfähige Flüssigkeit (*sheath-liquid*) appliziert, das die elektrische Kontaktierung zur Definition des Elektrospraypotentials ermöglicht. Zusätzlich kann bei dieser Variante der CE-MS-Kopplung nach der Trennung die Modifikation des Elektrolyten zur Verbesserung der Elektrospray-Eigenschaften vorgenommen werden. Abb. 45 zeigt die Trennung von Spermin, Arginin und Nicotinamid und deren MS-Detektion als extrahierte Massenspuren unter Verwendung eines 10mM Ammoniumacetat-Elektrolyten. Demnach führt die Zugabe von MeOH zur Erhöhung der Migrationszeiten der Analyten und zur Verbesserung der Auflösung. Sehr hohe Auflösungen bis $R=12,4$ bieten durch kürzere Kapillaren gleichzeitig die Möglichkeit zur drastischen Verringerung der Analysenzeit. Grundsätzlich besteht großer Optimierungsbedarf zur Erhöhung der Trenneffizienz. Deshalb werden im Folgenden Maßnahmen zur Verringerung der Peakbreiten untersucht.

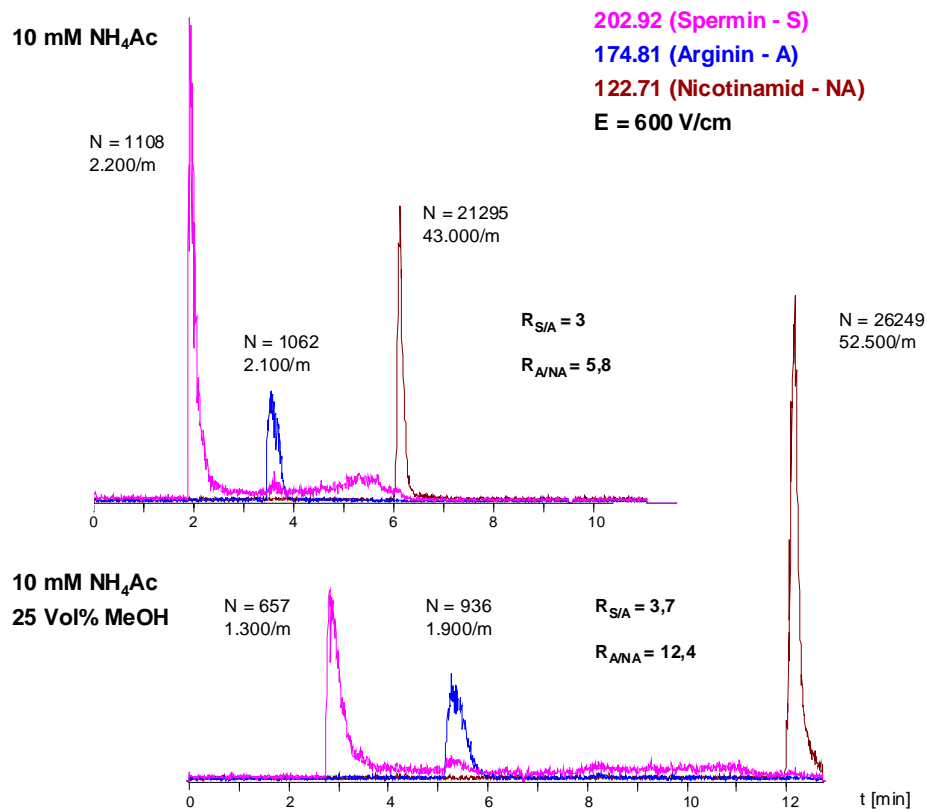


Abb. 45 Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie mit 10mM Ammoniumacetat ohne und mit 25 Vol % MeOH (Dokumentation der Versuchsbedingungen - Experimenteller Teil S. 48)

Feldstärke

Die Anpassung der Feldstärke hat große Bedeutung auf die Trenneffizienz. Hohe Feldstärken generieren hohe elektroosmotische Flüsse und elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten der Analyten, verursachen über die Joulesche Wärme aber auch Bandenverbreiterung.

Abb. 46 zeigt die Analyse von Spermin, Arginin und Nicotinamid in der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie in Abhängigkeit von unterschiedlichen Feldstärken.

Zwar kann durch Erhöhung der Feldstärke von 400 auf 500 V/cm die Trennstufenzahl von Nicotinamid mehr als vervierfacht werden, die Erhöhung auf 600 bis 700 V/cm hat jedoch den entgegengesetzten Effekt. Die gleiche Tendenz wird für die Auflösung zwischen Spermin und Arginin sowie Arginin und Nicotinamid beobachtet. Ursache ist die zunehmende Joulesche Wärme bei Feldstärken über 500 V/cm, die zur Bandenverbreiterung der Probe im Trennkanal führt. Die Beurteilung der Trennleistung sollte nicht nur von der Trenneffizienz ausgehen. Bei einer Feldstärke von 600 V/cm gegenüber 500V/cm werden für die Trennstufenzahl und Auflösung vergleichbare Ergebnisse erzielt aber gleichzeitig 2 min Analysezeit eingespart.

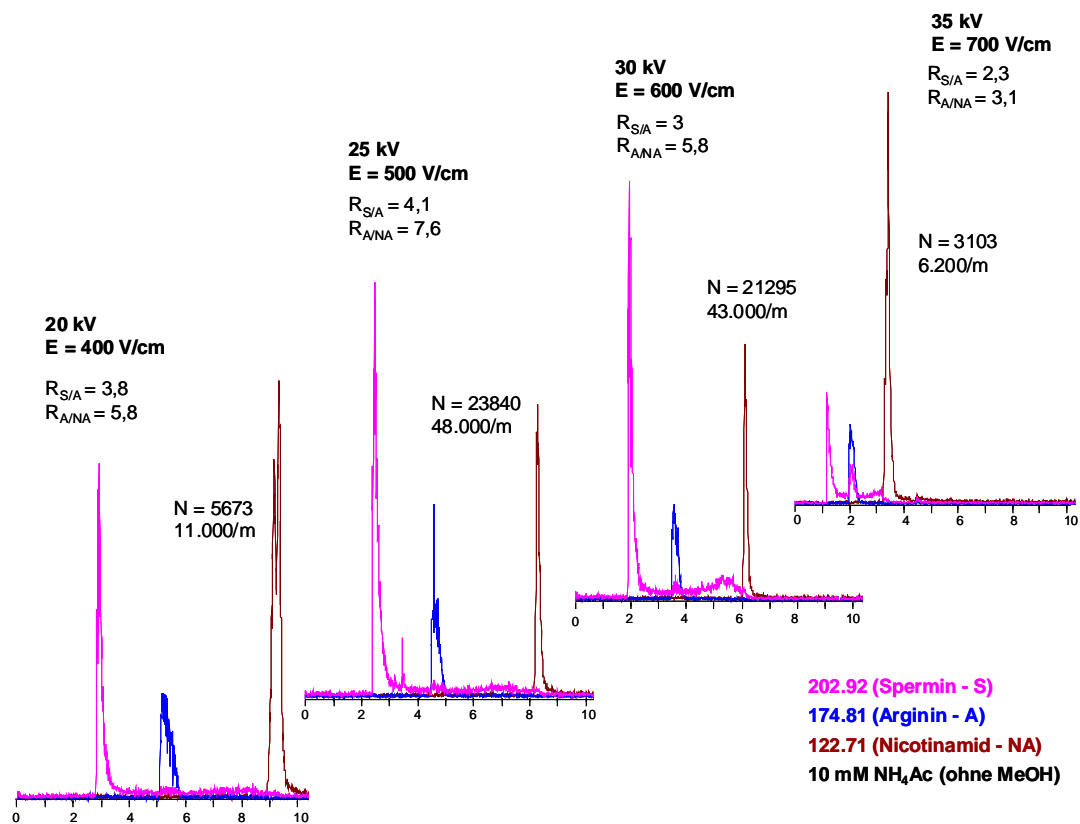


Abb. 46 Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie mit 10mM Ammoniumacetat bei unterschiedlichen Feldstärken (Dokumentation der Versuchsbedingungen - Experimenteller Teil S. 48)

Injektion

Zu hohe Analytkonzentrationen oder Injektionsvolumen verursachen die Überladung der Trennkapillare und damit Effizienzverluste. Die Anpassung der Injektionsparameter bietet deshalb Optimierungspotential zur Steigerung der Trenneffizienz. Mittels Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie wurde der Einfluss von Analytkonzentration und Injektionsspannung untersucht. Nach Abb. 47 ist zur Erhöhung der Trenneffizienz von Spermin, Arginin und Nicotinamid vor allem die Anpassung der Injektionsspannung zu empfehlen. So lässt sich die Trennstufenzahl von Nicotinamid durch Halbierung der Injektionsspannung verzehnfachen und bietet mit 120.000/m im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen einen akzeptablen Wert. Zwar ermöglicht der kommerzielle Sprayer den robusten *sheathflow* CE-MS Betrieb, durch den Emitterdurchmesser von 100 μm bildet sich jedoch ein großer Taylor-Konus aus, der erhebliches Totvolumen darstellt und für die hohen Peakbreiten mit verantwortlich ist. Zur weiteren Verbesserung der Trenneffizienz wäre deshalb eine drastische Reduzierung der Sprayerabmessungen vorteilhaft.

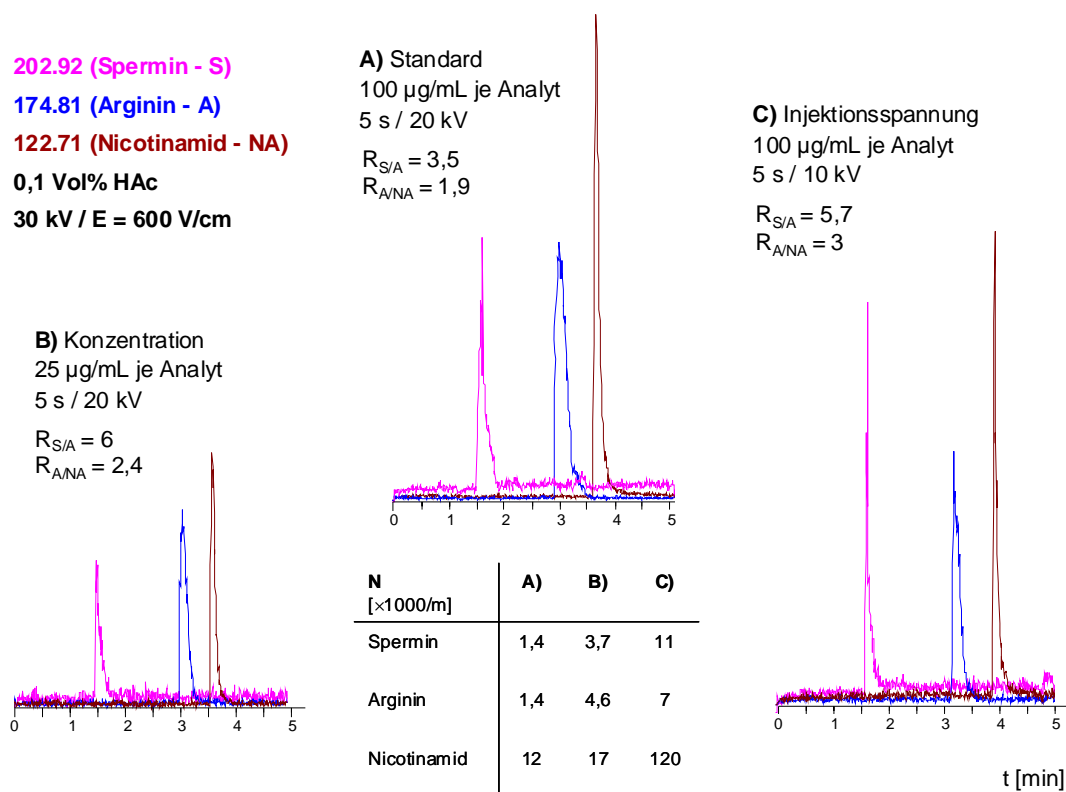


Abb. 47 Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie in wässriger 0,1 Vol%-iger Essigsäurelösung mit unterschiedlichen Injektionsparametern (Dokumentation der Versuchsbedingungen - Experimenteller Teil S. 48)

Kapillarwand-Beschichtungen

Neben der Anpassung der Injektionsparameter empfiehlt sich in der Kapillarelektrophorese zur Verbesserung der Trenneffizienz der Einsatz von Kapillarwand-Beschichtungen. Sie verringern Analyt-Wand-Wechselwirkungen und beeinflussen den elektroosmotischen Fluss (EOF). In diesem Zusammenhang ist das hydrophile Polymer Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) zur Unterdrückung des EOF weit verbreitet^{256,257} und wurde im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Das Beispiel zeigt die Analyse von Bradykinin, Angiotensin I, Somatostatin, Neurotensin, Leucin-Enkephalin und Eledoisin in der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS).

Nach Abb. 48 führt die Verwendung von HPMC (nur Spülen, keine dynamische Beschichtung) gegenüber der Referenz zur Basislinientrennung von Bradykinin und Angiotensin I. Außerdem verbessert sich die Trenneffizienz und Auflösung von Leu-Enkephalin und Eledoisin deutlich. Gleichzeitig wird bei Verwendung von HPMC eine Verringerung der Signalintensität des Totalionenstromes um ca. 60% beobachtet, ohne das HPMC bestimmten Massenspektren zugeordnet werden kann (Daten nicht gezeigt) und entspricht einer höheren Verdünnung von Elektrolyt und *sheath-liquid*. Da durch den Einsatz von HPMC die Trennleistung in der CE-MS für die hier verwendeten Analyten deutlich gesteigert werden kann, wird die Übertragung auf die Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie ausdrücklich empfohlen.

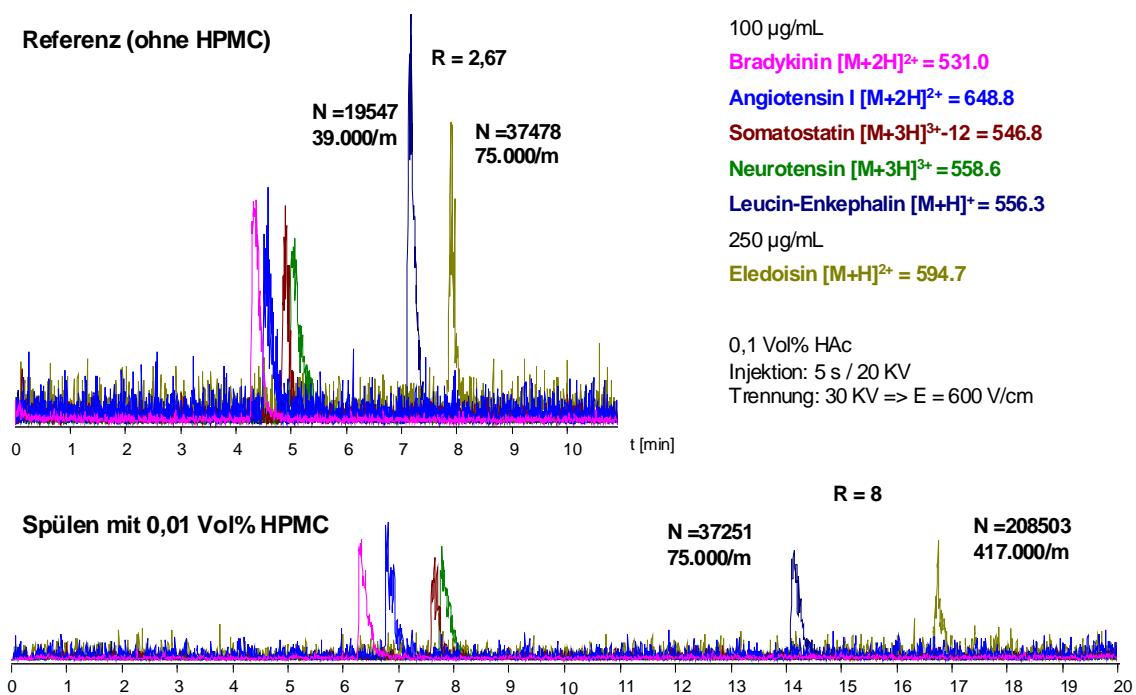


Abb.48 Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie eines Peptid-Testgemisches mit HPMC als Kapillarwand-Beschichtung (Dokumentation der Versuchsbedingungen - Experimenteller Teil S. 48)

Fazit

Alle vorgestellten Experimente zur Kapillarelektrophorese und Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie geben wichtige Optimierungstrends für die Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie wieder. Dabei wurde auf flüchtige Essigsäure- und Ammoniumacetat-Lösungen als MS-kompatible Elektrolyte fokussiert. Basislinientrennungen der ausgewählten Testgemische bestehend aus Amilorid, Leu-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid sowie Spermin, Arginin und Nicotinamid waren ohne Probleme umsetzbar.

Nimmt man längere Analysenzeiten in Kauf, sind für 0,1- oder 1 Vol% Essigsäure-Elektrolyten grundsätzlich höhere Ionenkonzentrationen zu empfehlen, weil sie höhere Trenneffizienzen ermöglichen. Als organischer Anteil im Trennelektrolyten wird außerdem Methanol auf Grund höherer Trennstufenzahlen gegenüber Acetonitril bevorzugt, wobei das Optimum bei 25 Vol% liegt. Gegenüber der Kapillarelektrophorese von Amilorid, Leu-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid wurden in der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie von Spermin, Arginin und Nicotinamid in der Mehrzahl deutlich geringe Trenneffizienzen ermittelt. Eine effektive Möglichkeit zur Steigerung der Trenneffizienz in der elektrokinetischen Injektion ist die Anpassung der Injektionsspannung. Die herausragende Bedeutung optimaler Injektionsparameter bei der Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie wird noch an anderer Stelle verdeutlicht.

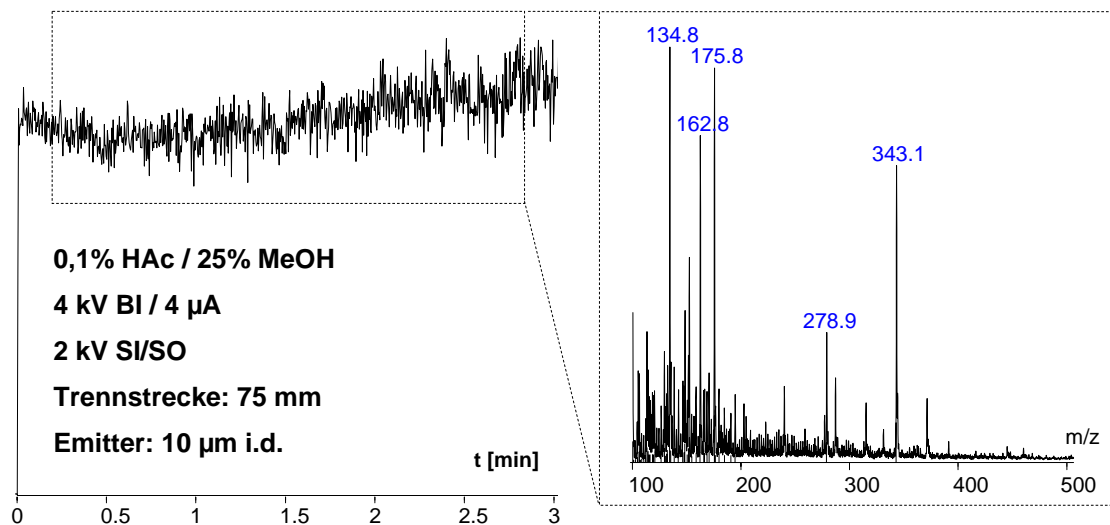
Besonderes Augenmerk liegt auch auf der richtigen Wahl der Trennfeldstärke. Wie gezeigt wurde, führen Erhöhungen nicht zwangsläufig zu verbesserten Trenneffizienzen und Auflösungen. Zur Analyse von Spermin, Arginin und Nicotinamid in wässriger 10 mM Ammoniumacetat-Lösung sind Feldstärken von 500 V/cm am besten geeignet.

Im Rahmen der Experimente mit Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie wurde außerdem der Einfluss von Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) als Kapillarwand-Beschichtung untersucht. Im Hinblick auf anspruchsvolle Trennungen von Realproben wurde zu diesem Zweck zusätzlich ein 6-Peptid-Testgemisch aus Bradykinin, Angiotensin I, Somatostatin, Neurotensin, Leucin-Enkephalin und Eledoisin eingeführt. Ohne negative Beeinflussung der MS-Detektierbarkeit beinhaltet der Einsatz des hydrophilen Polymers die Steigerung von Trenneffizienz und Auflösung, weshalb dessen Übertragung auf die Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie vielversprechend ist.

4.3.3 Systemstabilität

Für die praktische Durchführung der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (MCE-MS) ist die Gewährleistung der Systemstabilität zwingend erforderlich. Darunter versteht man den konstanten Verlauf des Totalionenstromes als Basislinie für die MS-Detektion und konstante Ströme in den mikrofluidischen Kanälen während der Injektion und Trennung. Zu diesem Zweck müssen die angelegten Spannungen an die verwendeten Elektrolyten angepasst werden, infolgedessen sich die Feldstärken ändern. Um die Vergleichbarkeit der MCE-MS-Ergebnisse sicherzustellen, sind jedoch einheitliche Feldstärken notwendig. Dies ist umso schwieriger, wenn wie in dieser Arbeit, Mikrochips mit unterschiedlichen Trennstrecken verwendet wurden.

Abb. 49 zeigt den konstanten Verlauf des Totalionenstromes über 3 min mit dazugehörigem MS-Hintergrundspektrum und dokumentiert damit die Systemstabilität für die MS-Detektion. Da unter den gegebenen Bedingungen die stabile MS-Detektion nur durch die Flussrate des Elektrosprays und das Volumen des Flüssigkeitsreservoirs beschränkt wird, könnte die MS-Analyse auch weit über 3 min hinaus durchgeführt werden.



Tab. 49 konstanter Verlauf des Totalionenstromes (TIC) mit MS-Hintergrundspektrum belegt Systemstabilität der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie-Kopplung (serieller Ansatz)

Neben dem konstanten Verlauf des Totalionenstromes als Basislinie der MS-Detektion sind stabile Ströme im Injektions- und Trennkanal während der Analysen für die erfolgreiche Durchführung der MCE-MS-Experimente zwingend erforderlich. Abb. 50 stellt die Ströme am Injektionskreuz eines Chips im seriellen Ansatz unter den gegebenen Spannungen schematisch dar. Aufgrund der Reihenschaltung des hohen Elektrospray-Widerstandes und des Widerstandes

im Trennkanal fließt in Richtung Emitter nur ein sehr kleiner Strom ($\ll 1 \mu\text{A}$). Am BI-Vial fließt ein Strom von $4 \mu\text{A}$. Nach dem 1. Kirchhoffschen Satz ist an einem Knotenpunkt (Injektionskreuz) die Summe der zufließenden gleich die Summe der abfließenden Ströme. Infolgedessen und aufgrund der symmetrischen Anordnung werden an den SI/SO-Vials gleich hohe Ströme von je $2 \mu\text{A}$ gemessen.

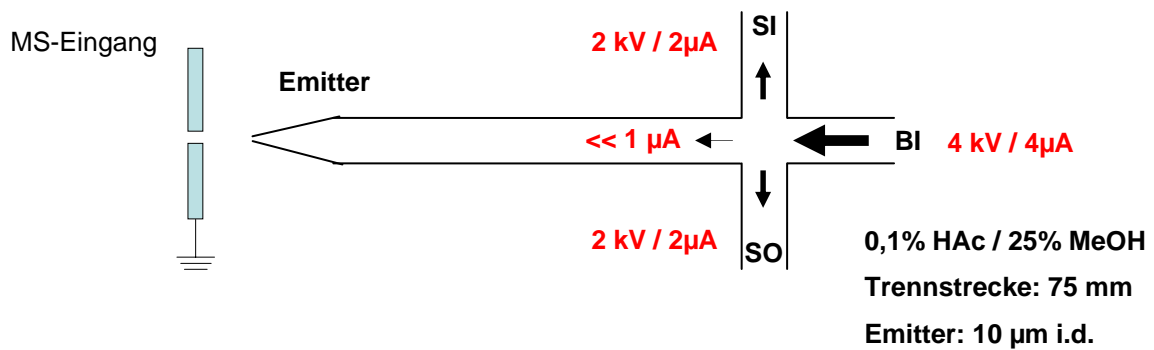


Abb. 50 Angelegte Spannungen und gemessene Ströme in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie

Nach der schematischen Darstellung der Ströme am Injektionskreuz fasst Tab. 8 die gemessenen Stromstärken am BI-Vial für häufig verwendete Elektrolyte in Abhängigkeit von den angelegten Spannungen zusammen. Während hohe Elektrolytkonzentrationen bei Essigsäure und Ammoniumacetat den Betrieb bei hohen Spannungen (SI/SO - 4 kV / BI - 8 kV) ausschließen, bietet der Standardelektrolyt mit 0,1 Vol % Essigsäure und 25 Vol % MeOH für den verwendeten Chip im seriellen Layout (Trennstrecke: 75 mm / i.d. = 10 μm) stabile Messbedingungen über einen weiten Bereich und damit gutes Optimierungspotential.

Tab. 8 Systemstabilität in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie unter Verwendung des seriellen Layouts (Trennstrecke: 75 mm / i.d. = 10 μm) als gemessene Stromstärken abhängig von Elektrolyt-/ Konzentration und der angelegten Spannung

I [μA] am BI-Vial	SI/SO - 1 kV	SI/SO - 2 kV	SI/SO - 4 kV
	BI - 2 kV	BI - 4 kV	BI - 8 kV
0,1 Vol % HAc / pH 3,5 25 Vol % MeOH	2	4	10
1 Vol % HAc / pH 2,8 25 Vol % MeOH	3	8	18-100 => Joulesche Wärme (instabil)
10 mM NH₄Ac / pH 6,9 25 Vol % MeOH	4	8	15-25 kein MS-Spektrum

4.3.4 Serielles Layout

Das Chip-Design im seriellen Layout stellt die einfachste Möglichkeit zur Durchführung der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (MCE-MS) dar. Bei dieser Variante wird auf die direkte elektrische Kontaktierung des Emitters verzichtet. Das Elektrospraypotential ergibt sich aus der Subtraktion von Spannung im Injektionskreuz und dem Spannungsabfall über den Trennkanal (Stromstärke \times spez. Widerstand). Großer Vorteil des seriellen Layouts ist, dass teure Mikrochips mehrfach zur Emittierfertigung verwendet werden können. Dies war insbesondere für die Entwicklung des Herstellungsprozesses von großer Bedeutung.

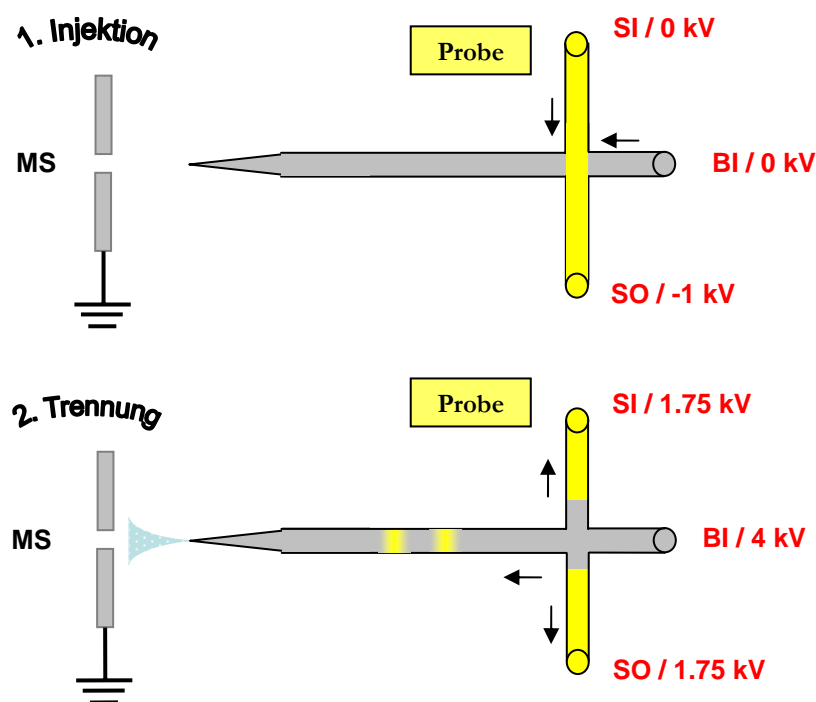


Abb. 51 Prinzip der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (MCE-MS) im Seriellen Layout mit angelegten Spannungen während der Injektion und Trennung

Abb. 51 zeigt das Prinzip der MCE-MS im seriellen Modus. Standardmäßig wurden folgende Spannungen verwendet. Injektion: -1 kV an SO-Vial und 0 kV an SI-/BI-Vial // Trennung: 1,75 kV an SI-/SO-Vial und 4 kV an BI-Vial. Der Abstand zwischen Emitterspitze und geerdetem MS-Eingang betrug jeweils 0,5 mm. An dieser Stelle sei explizit darauf hingewiesen, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt durch unterschiedlich lange Chips nur uneinheitliche Trennstrecken zur Verfügung standen. Die nicht zu definierende Elektrosprayspannung am Emitter macht die Determination gleicher Feldstärken unmöglich. Die dargestellten Experimente können deshalb nur Trends zur Methodenentwicklung in der MCE-MS wiedergeben.

Die Fluoreszenz-Videomikroskopie zur Visualisierung der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie ist ein wertvolles Hilfsmittel um Injektionsparameter beurteilen zu können. Zu diesem Zweck wird Fluorescein-Lösung im SI-Vial vorgelegt. Als Lichtquelle dient die Quecksilberdampfampe des Olympus-Mikroskops. Zur Anregung und Emission stehen Filterkuben von $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}} = 488/515 \text{ nm}$ zur Verfügung. Abb. 52 zeigt den Fluorescein-Fluss während der Injektion und Trennung. Ein direkt vor der Emitterspitze positionierter und geerdeter Kupferstab (0 kV) entspricht dem Eingang zum Massenspektrometer.

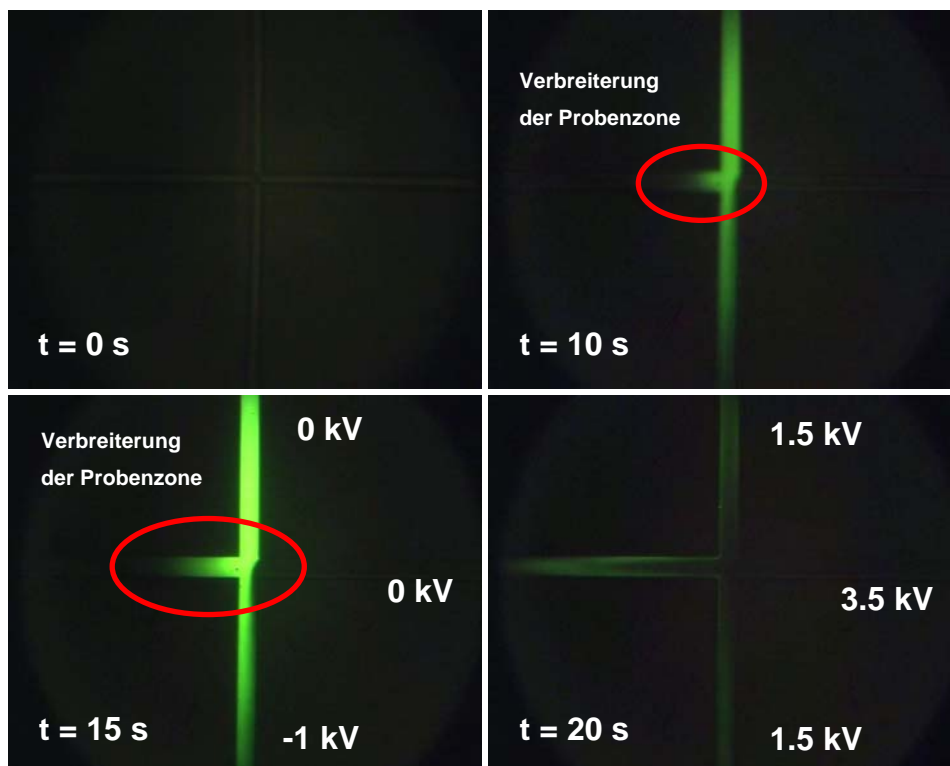


Abb. 52 Fluoreszenz-Videomikroskopie im Seriellen Layout (0,5 mg/mL Fluorescein-Lösung) Injektion mit -1 kV (SO-Vial) alle andere Vials mit 0 kV/ Trennung mit 1,5 kV (SI/SO-Vial) und 3,5kV (BI-Vial)

Für die Injektion im Seriellen Layout ist die Verbreiterung der Probenzone charakteristisch. Bei den angelegten Spannungen nach Abb. 52 ist sie bereits nach 10 s erkennbar und nach 15 s deutlich ausgeprägt. Im Gegensatz dazu erscheint die Rücklaufspannung (Spannungsdifferenz zwischen BI- und SI/SO-Vials) ausreichend, um nach Umschalten in den Trennmodus bei 20 s das Nachlaufen von Probe aus den Seitenkanälen in den Trennkanal zu verhindern. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Verbreiterung der Probenzone negative Auswirkungen auf die Peakbreiten in der MCE-MS hat. Stehen ausschließlich Chips im Seriellen Layout, ohne elektrische Emitter-Kontaktierung und Reservoirs zur Speisung einer Rücklaufströmung zur Verfügung, besitzt die Optimierung der Injektionsparameter, insbesondere der Injektionszeit, absolute Priorität.

Das Ergebnis suboptimaler Injektionen im seriellen Layout verdeutlicht Abb. 53. Gezeigt sind MCE-MS-Analysen von Spermin, Arginin und Nicotinamid unter Verwendung verschiedener Injektionszeiten. Darunter versteht man die Zeitdauer der elektrokinetischen Injektion bis zum Umschalten in den Trennmodus.

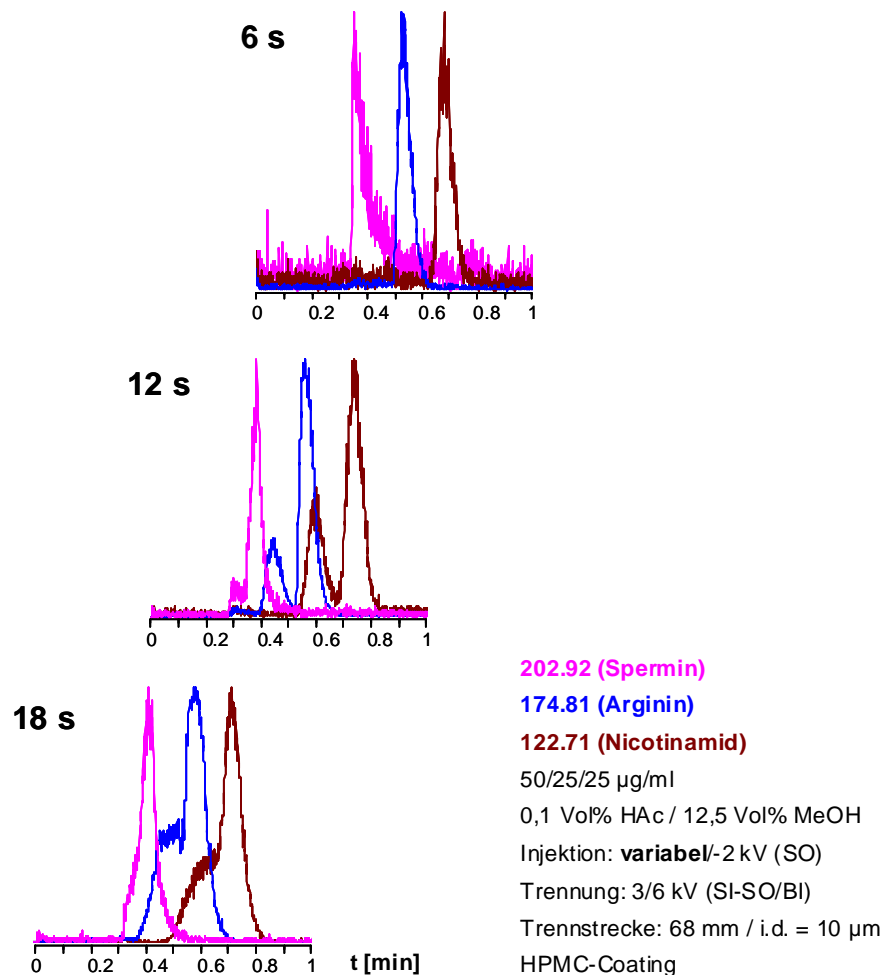


Abb. 53 Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie im seriellen Layout mit verschiedenen Injektionszeiten

Bei der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie im seriellen Layout resultieren aus zu langen Injektionszeiten breite Peaks (18 s), die Doppelinjektionen (12 s) darstellen. Ursache ist die fehlende Rücklaufspannung zur Pinzetteninjektion, die den Eintritt von Probe in den Trennkanal während der Injektion verhindert. Dadurch entstehen sehr breite Probezonen. Die in der Diskussion zur Fluoreszenz-Videomikroskopie geäußerte Vermutung über die Auswirkungen zu langer Injektionszeiten wird hiermit bestätigt. Um effiziente MCE-MS-Analysen zu ermöglichen, ist die Probenfokussierung als Pinzetteninjektion zwingend. Nur über geringe Peakbreiten lassen sich hohe Trennstufenzahlen und Auflösungen generieren. Außerdem setzen geringe Nachweisgrenzen ausreichende Injektionszeiten voraus.

Bei der Diskussion der Ergebnisse aus der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie sei nochmals ausdrücklich daraufhingewiesen, dass die vorgestellten Experimente im seriellen Layout aufgrund der unterschiedlichen Trennstrecken nur Trends wiedergeben können. Auch werden Ergebnisse gezeigt, die im Verlauf der Entwicklung des Herstellungsverfahrens erzielt wurden. Deshalb können sich sowohl Trennstrecken als auch Emitterdurchmesser unterscheiden (i.d. = 10-, 13- und 20 μm). Dieser Umstand hat zur Folge, dass die MCE-MS-Ergebnisse verschiedener Chips im seriellen Layout nicht miteinander vergleichbar sind.

In der ersten Analyse von Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid (BFMTZ) und Bumetanid wird der Einfluss der Essigsäure-Konzentration untersucht. Nach Abb. 54 können unter Verwendung einer 1 Vol%-iger Essigsäure-Lösung Basislinientrennungen erzielt werden. Die höheren Migrationszeiten der Analyten (1 vs. 0,1 Vol % HAc), können auf die Reduzierung des elektroosmotischen Flusses bei höheren Ionenkonzentrationen zurückgeführt werden. Für den oft verwendeten Standardelektrolyten mit 0,1 Vol% Essigsäure und 25 Vol% MeOH liegt hier Comigration der Analyten vor. Gleichwohl konnten mit diesem Elektrolyten aber auf anderen Elektrophorese-Chips Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid Basislinien getrennt werden.

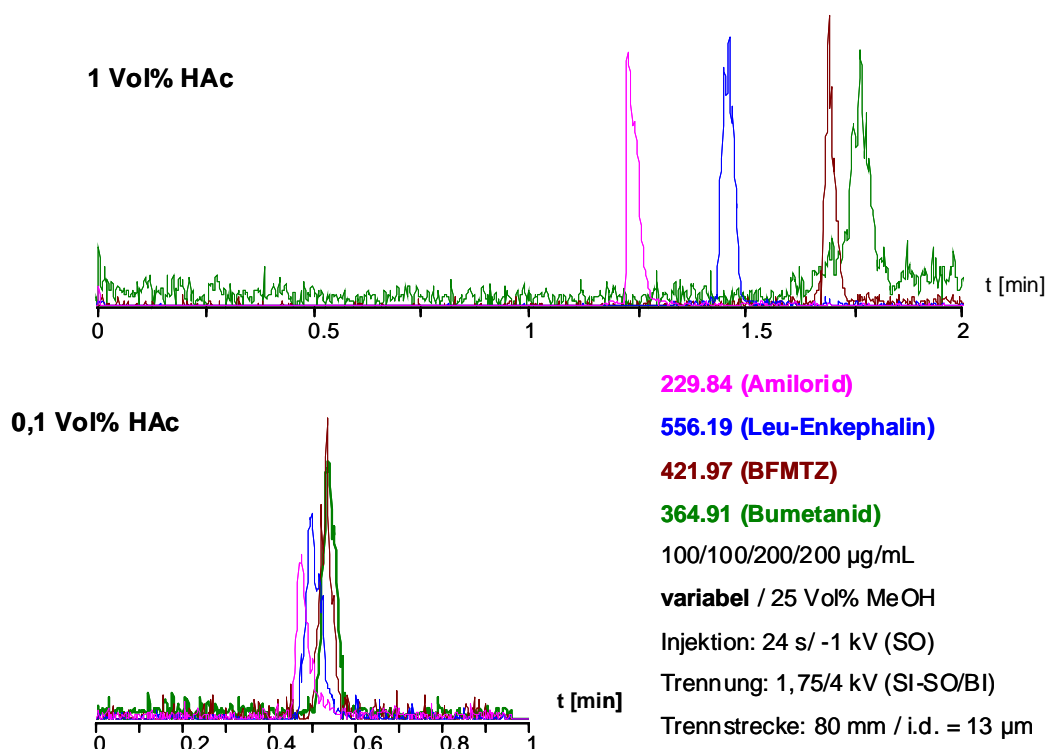


Abb. 54 Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie im seriellen Layout mit zwei verschiedenen HAc-Elektrolyten

Die Konditionierung der Mikrochips, zur Gewährleistung konstanter Oberflächeneigenschaften im mikrofluidischen Trennkanal ist aufgrund der vielen Spülschritte mit Piranha-Lösung, Wasser, Natronlauge und Trennelektrolyt sehr zeitaufwendig und erfordert viel Geschick. Um den Messdurchsatz in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie zu erhöhen, wurde die Möglichkeit von Wiederholungsmessungen ohne Konditionierung (nur Spülen mit Elektrolyt) untersucht. Abb. 55 beinhaltet die 3./5. und 10. Messung einer Serie zur Analyse von Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid.

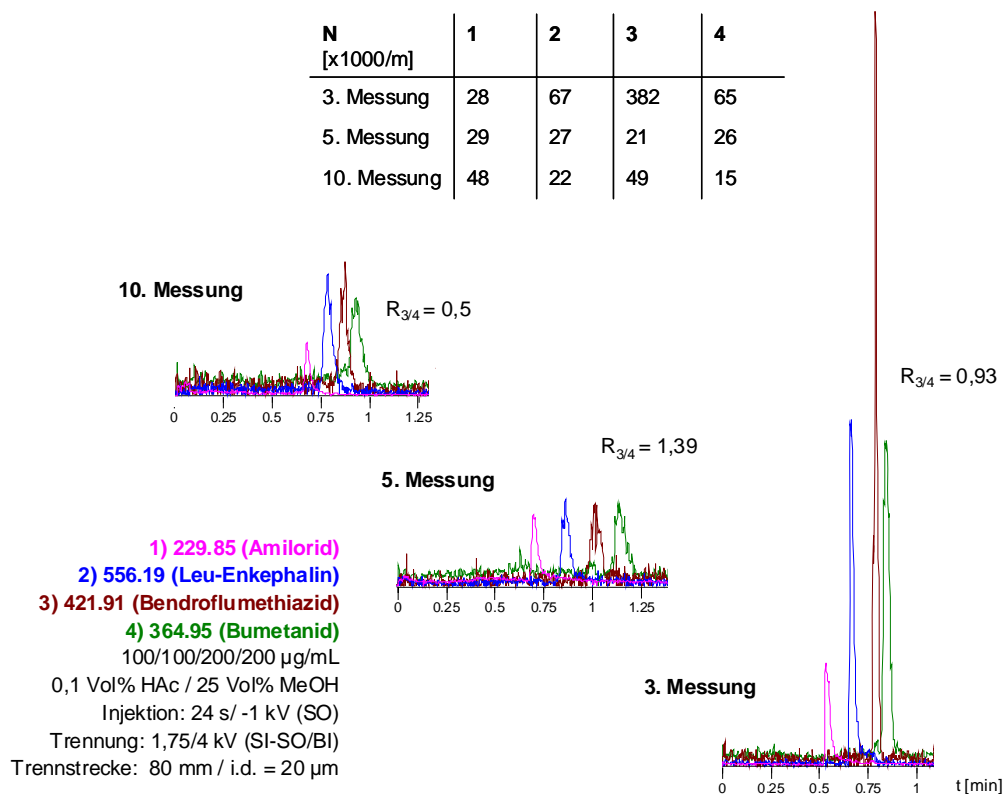


Abb. 55 Messreihe in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie im seriellen Layout ohne Konditionierung der Mikrochips zur Gewährleistung konstanter Oberflächeneigenschaften (nur Spülen mit Elektrolyt-Lösung)

Aus Abb. 55 geht die Bedeutung der Chip-Konditionierung hervor. Prinzipiell lassen sich Auftrennungen von Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid in einer Messreihe ohne aufwendige Chip-Konditionierung durchführen. Dabei verschlechtern sich Trenneffizienzen und Auflösung im Laufe der Messzyklen jedoch drastisch. Hier zeigt sich die große Schwachstelle im aktuellen MCE-MS Versuchsaufbau. Schnelle effiziente Analysen stehen im Widerspruch zu zeit- und arbeitsintensiven Spülschritten. Die beobachtete Tendenz ist bereits aus der Kapillarelektrophorese bekannt, weshalb kommerzielle Systeme vor jeder Analyse automatisierte Konditionierungsprotokolle durchführen. Als parallelisierter Ansatz (1. Chip in der Konditionierung / 2. Chip in der Analyse) ließe sich der Messdurchsatz in der MCE-MS deutlich

erhöhen. Die Alternative wären preiswerte Glaschips mit einheitlichen Oberflächeneigenschaften zum Einmalgebrauch (Einwegchips), die langfristig durch kostengünstige Massenproduktion in hohen Stückzahlen verfügbar sein könnten. Eine wichtige Möglichkeit zur Manipulation der Oberflächeneigenschaften in Einweg- und Mehrwegchips ist die Verwendung von Kapillar-Beschichtungen, weil dadurch Analyt-Wand-Wechselwirkungen verringert werden können. Zu diesem Zweck ist Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) in der Kapillarelektrophorese etabliert (S. 74) und konnte erfolgreich auf die MCE-MS übertragen werden. Die Verbesserung der Trennleistung durch Spülen des Trennkanals mit 0,01%-iger HPMC-Lösung zeigt Abb. 56.

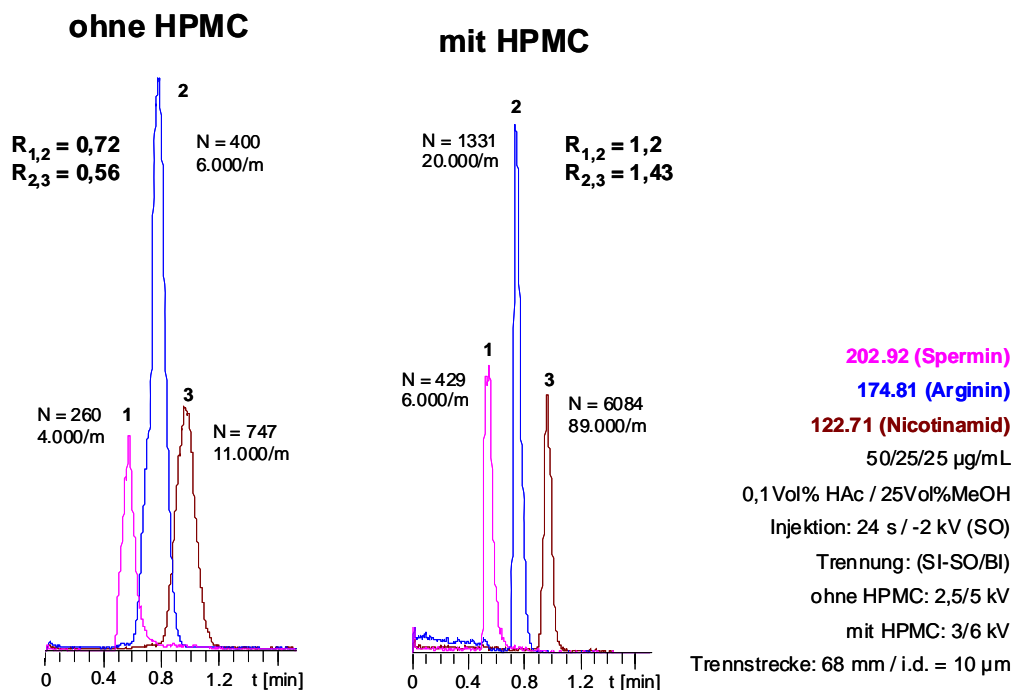


Abb. 56 Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie im seriellen Layout mit Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) als Kapillarwand-Beschichtung zur Verbesserung von Trenneffizienz und Auflösung

Durch den Einsatz von HPMC lässt sich im dargestellten Beispiel die Trenneffizienz von Nicotinamid verachtfachen und die Auflösung zwischen Arginin und Nicotinamid verdreifachen. Wiederholungsmessungen ($n=6$) ergaben außerdem eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit. Bei Gebrauch von HPMC reduzierte sich die relative Standardabweichung der Migrationszeit des Arginins von 6% auf 2%. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass im gezeigten Experiment unterschiedliche Spannungen angelegt wurden, weil sonst die Systemstabilität nicht gewährleistet werden konnte. Aus diesem Grund erfolgte die Messung im Experiment ohne HPMC gegenüber dem Experiment mit HPMC bei reduzierten Spannungen an SI-SO/BI-Vials mit 2,5 und 5 kV anstatt 3 und 6 kV. Die Ergebnisse werden hier aufgeführt, weil sie klar die Steigerung der Trennleistung in der MCE-MS durch die Verwendung von HPMC wiedergeben.

4.3.5 Make-Up Flow Layout

Die ersten Ergebnisse dieser Arbeit in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (MCE-MS) wurden mit Hilfe von Chips im seriellen Layout erzielt, wodurch die Machbarkeit (*Proof of Principle*) demonstriert wird. Gleichzeitig weisen die ermittelten Trenneffizienzen erhebliches Verbesserungspotential auf. Wesentlicher Nachteil bei der Analyse im seriellen Modus ist die starke Verbreiterung der Probenzone während der Injektionsphase, wie mittels Fluoreszenz-Videomikroskopie gezeigt werden konnte.

Als Alternative zum Seriellen Layout wird im Rahmen dieser Arbeit der Prototyp eines Chips im Make-Up Flow Layout vorgestellt und auf Eignung in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie untersucht. Neben der klassischen Kreuzstruktur von Injektions- und Trennkanal verfügt er über Liquid Reservoirs L 1 / L 2 (Make-Up Flow). Hierüber kann die Elektrospannung am Emitter definiert werden. Das Design bietet außerdem die Möglichkeit den Elektrolyten nach der elektrophoretischen Trennung, z. B. durch Veränderung des organischen Anteils, zu modifizieren, um die MS-Detektion zu verbessern. Außerdem wurden auf dem Chip zur Durchführung chemischer Reaktionen Mischungskammern integriert, die für enzymatische Reaktionen mit Substanzen kleiner Diffusionskoeffizienten (z. B. Rinderserumalbumin mit $D = 6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)²⁵⁸ dimensioniert sind. Abb. 57 gibt die Abmessungen des Chips im Make-Up Flow Layout wieder. Aus dem Design fertigte die Firma Capilix (Leeuwarden/Niederlande) einen Prototyp-Chip aus Glas.

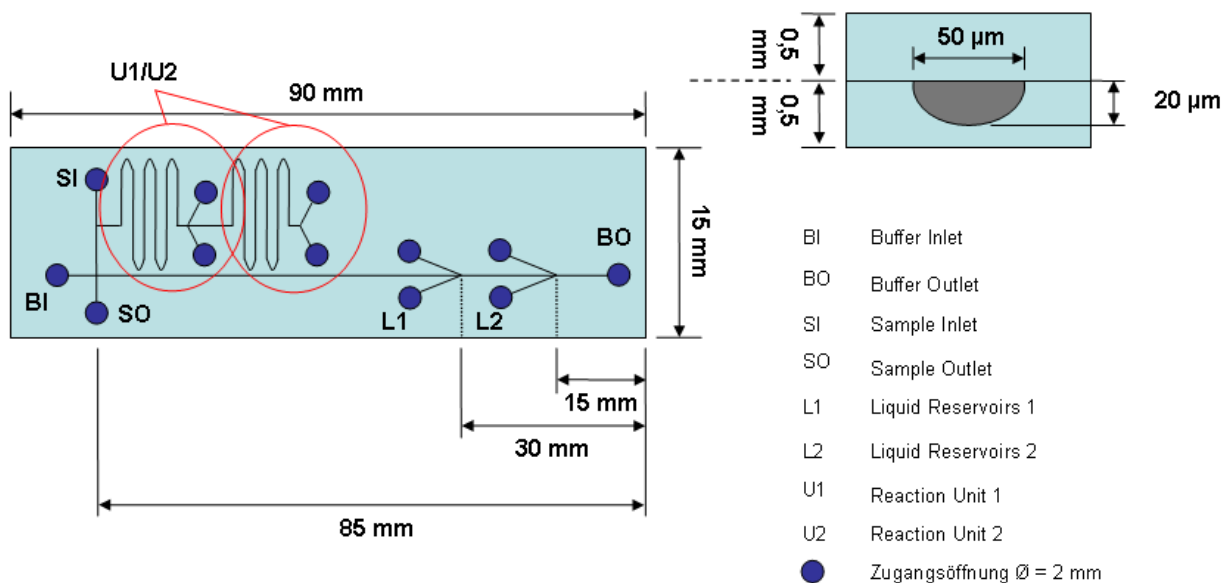


Abb. 57 Design eines Elektrophorese-Chips im Make-Up Flow Layout

Ansicht von oben (links) und als Seitenansicht (rechts) mit dem Querschnitt des Mikrofluidikkanals

An dieser Stelle sei daraufhingewiesen, dass die Anordnung von Injektions- und Trennkanal beim Prototyp im Make-Up Flow Layout vom klassischen, symmetrischen Kreuzungslayout abweicht. In der asymmetrischen Anordnung unseres Prototypen beträgt der Abstand zwischen SI-Vial zum Injektionskreuz 7,5 mm, aber nur je 2,5 mm vom Injektionskreuz zum SO-/BI-Vial. Ursache ist die Art der Anordnung der Reaktionskammern. Eine weitere Abweichung ist die geringere Chipdicke von 1 mm gegenüber 1,8-/2,2 mm bei herkömmlichen Mikrochips. Infolge der dünnen Deckplatten von nur 0,5 mm verkleinert sich außerdem das Volumen der Zugangsöffnungen (*Vials*) von 2,5- auf 1,5 μL .

Abb. 58 zeigt den Prototyp-Chip im Make-Up Flow Layout und verdeutlicht das Prinzip der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (MCE-MS) in diesem Modus. Die Injektion der Probe erfolgt durch Anlegen von -1 kV am SO-Vial während an allen anderen Vials (M1-2/SI/BI) 0 kV anliegen. Gute Ergebnisse in der MCE-MS konnten mit folgenden Spannungen während der Trennphase erzielt werden: M1-2 je 1 kV, BI 3 kV, SI 0,75 kV und SO 1,75 kV. Die voneinander abweichenden Werte am SI-/SO-Vial sind durch die asymmetrische Längen der Mikrofluidikkanäle am Injektionskreuz bedingt. In zukünftigen Make-Up Flow Layouts sollte unbedingt wieder auf die symmetrische Anordnung der SI-SO/BI-Vials zurückgegriffen werden. Sie ist deutlich anwenderfreundlicher und verhindert Kriechströme über ausgetretenen Elektrolyt zwischen zu eng aneinander liegenden Reservoirs.

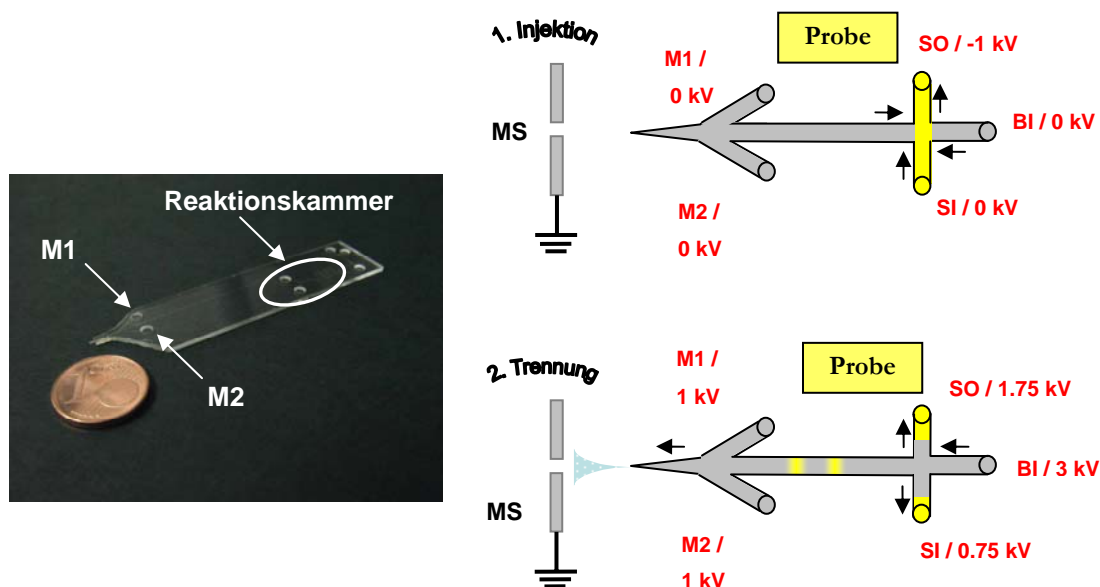


Abb. 58 Chip im Make-Up Flow Layout und Prinzip der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie in diesem Modus mit angelegten Spannungen während Injektion und Trennung

Analog zum Seriellen Ansatz kommt zur Visualisierung der Injektion im Make-Up Flow Modus die Fluoreszenz-Videomikroskopie (S. 79) mit Fluorescein-Lösung zum Einsatz. Abb. 59 beinhaltet Momentaufnahmen aus der Injektions- (0-, 5-, 15 s) und Trennphase (20 s).

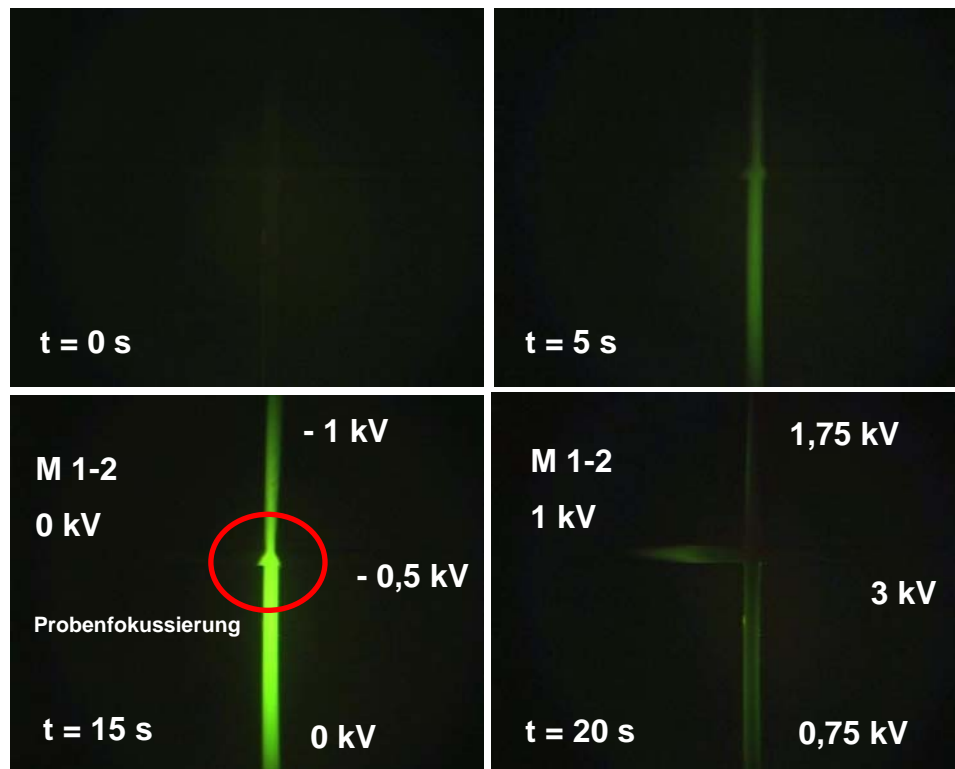


Abb. 59 Fluoreszenz-Videomikroskopie im Make-Up Flow Layout (Fluorescein-Lösung / $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 515 \text{ nm}$) Injektion mit -1 kV (SO) / -0,5 kV (BI) und 0 kV (SI/SF 1-2) // Trennung mit 1,75 kV (SO) / 3 kV (BI) / 0,75 kV (SI) und 1 kV (SF 1-2)

Demnach bietet das Make-Up Flow Layout einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem seriellen Ansatz. Anlegen von 0 kV an den Make-Up Flow Vials während der Injektion induziert Rücklaufströmung, so dass die Probe im Injektionskreuz fokussiert wird (Pinzetteninjektion). Die resultierende Verringerung der Probenzone entspricht geringeren Peakbreiten und damit höherer Trenneffizienz und Auflösung. Definierte Elektrosprayspannungen während der Trennung bieten außerdem die Möglichkeit exakte Feldstärken anzugeben. Zur Durchführung von Trennungsoptimierungen ist dies von außerordentlicher Bedeutung, weil dadurch Ergebnisse von Chips mit unterschiedlichen Trennstrecken miteinander verglichen werden können. Neben der verbesserten Injektion und der Möglichkeit Trennfeldstärken zu definieren, eröffnet die Kanalstruktur des Make-Up Flow Layouts außerdem die Chance, elektrophoretische Trennung und MS-Detektion unabhängig voneinander zu optimieren. Zur Verdeutlichung sei folgendes Experiment vorgestellt.

Abb. 60 zeigt zwei Analysen von Amilorid, Leu-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie unter Verwendung verschiedener Elektrolyte in Trennkanal und Make-Up Flow Vials. Referenzmessung ist dabei das untere Experiment mit einheitlicher Befüllung des ganzen Mikrochips mit 0,1 Vol% HAc und 25 Vol% MeOH. Werden, wie im oberen Experiment, unterschiedliche Elektrolyten für die Elektrophorese (0,1 Vol% HAc im Trennkanal) und MS-Detektion (0,1 Vol% HAc/50 Vol% in den Make-Up Flow Vials) eingesetzt, kann die Auflösung zwischen Bendroflumethiazid und Bumetanid gegenüber der Referenzmessung verdoppelt werden. Somit ermöglichen in diesem Fall rein wässrige Systeme bessere elektrophoretische Trennungen, während die Modifikation zur MS-Detektion auch nachträglich über die Make-Up Flow Vials erfolgt. Über variable Zusammensetzungen der Elektrolyten in der erweiterten Kanalstruktur erschließt sich dadurch erhebliches Potential zur Trennungsoptimierung bei der Analyse anspruchsvoller Realproben. Dabei wären außerdem längere Trennstrecken zur Erhöhung der Peakkapazität von Vorteil.

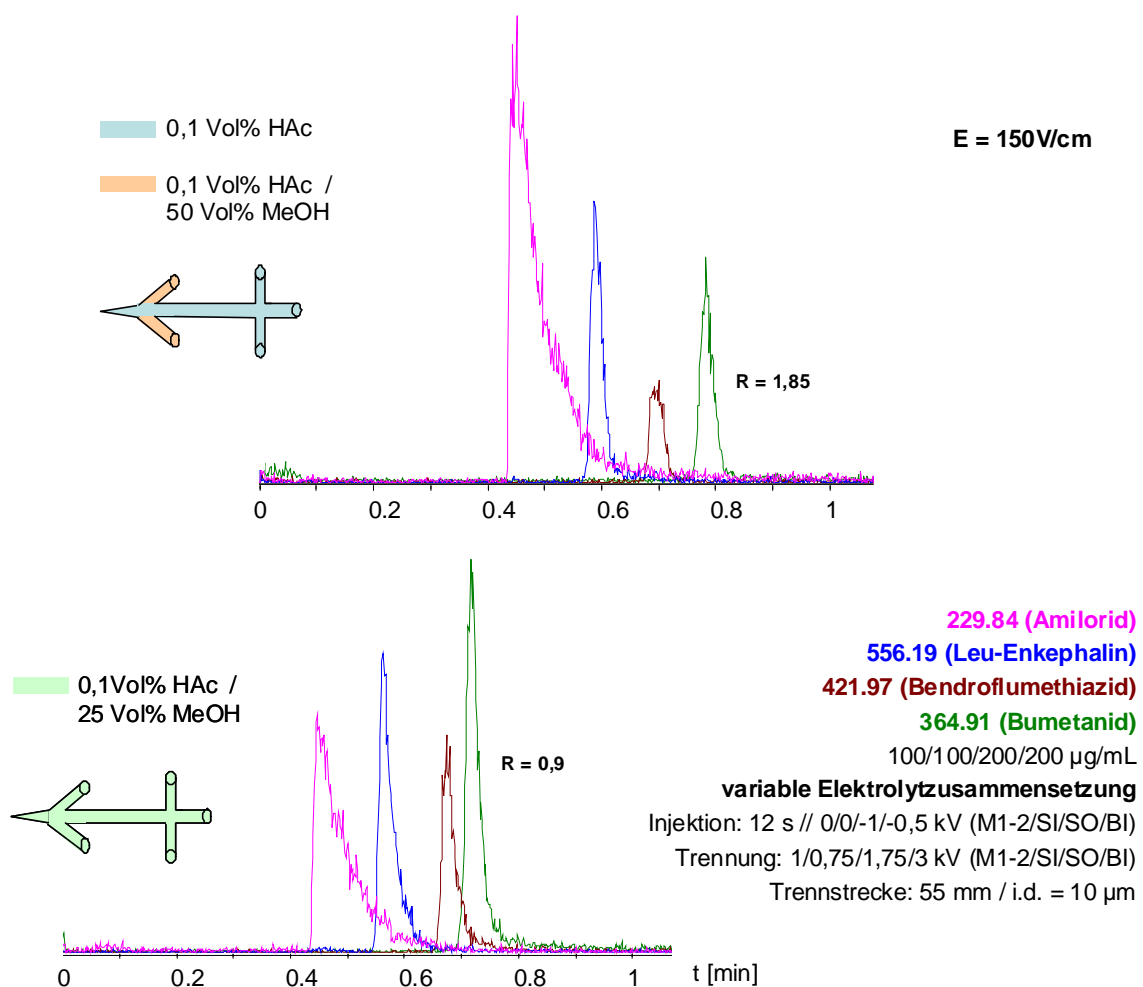


Abb. 60 Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie im Make-Up Flow Layout mit verschiedener Elektrolyten in Trennkanal und Make-Up Flow Vials

Angelegte Spannungen haben aufgrund der direkten Proportionalität zwischen Feldstärke und elektrophoretischer/elektroosmotischer Wanderungsgeschwindigkeit (Gl. 1 und 3) großen Einfluss auf die Trennleistung. Mit der Verfügbarkeit von Elektrophorese-Chips im Make-Up Flow Layout kann die Feldstärke bei der Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie definiert werden. Abb. 61 dokumentiert die Steigerung der Trennstufenzahlen von Spermin, Arginin und Nicotinamid durch Erhöhung der Spannung am BI-Vial von 4 kV auf 4,5 kV, die der Erhöhung der Feldstärke von $E = 260$ auf 290 V/cm entspricht. Dabei ist zu beachten, dass die Messung im Standardelektrolyten (0,1 Vol % HAc mit 25 Vol% MeOH) bei $E = 290$ V/cm einen Anfangsstrom von $I = 20$ μ A verursacht, der jedoch während der Messung aufgrund der Wärmeentwicklung im Trennkanal stark ansteigt und großen Schwankungen unterliegt. Die asymmetrische Anordnung der Vials am Injektionskreuz wirkt sich unter dieser Umständen besonders negativ aus, weil hohe Spannungen über heraustretenden Analyten sehr leicht Kurzschlussströme verursachen, so dass die Systemstabilität nicht mehr gewährleistet ist.

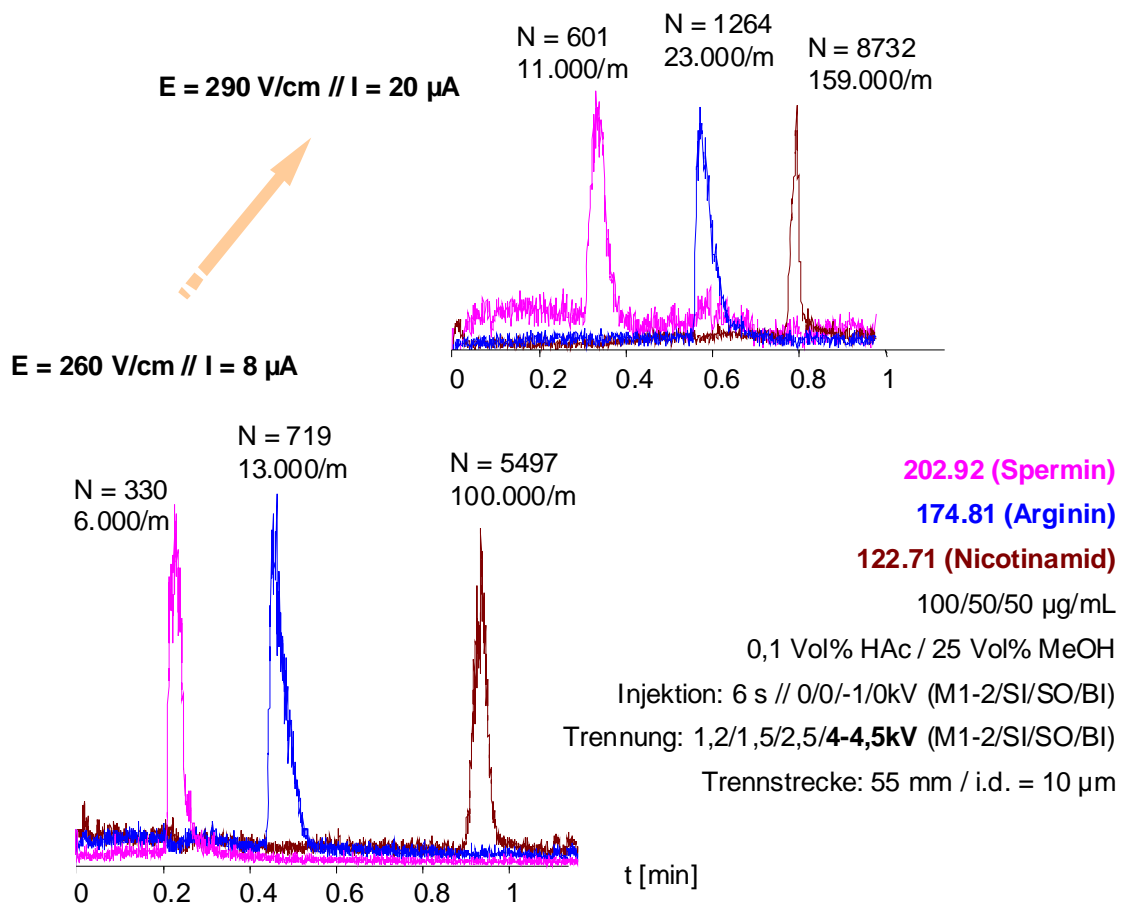


Abb. 61 Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie im Make-Up Flow Layout unter dem Einfluss verschiedener Trennfeldstärken

Vergleich Serielles und Make-Up Flow Layout

Prinzipiell ermöglichen beide Chip-Konfigurationen im Serielles- und Make-Up Flow Layout die Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie zur Auftrennung und Detektion von Amilorid, Leu-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid sowie von Spermin, Arginin und Nicotinamid.

Wie mittels Fluoreszenz-Videomikroskopie dokumentiert wurde, besteht der wesentliche Vorteil beim Make-Up Flow Modus gegenüber dem Serielles Ansatz in der Pinzetteninjektion. Durch Generierung einer Rücklaufströmung erfolgt Probenfokussierung im Injektionskreuz. Aus den schmaleren Probenzonen resultiert in der Folge eine höhere Trenneffizienz durch verringerte Peakbreiten. In Bezug auf die Trenneffizienz liegt bisher leider noch kein direkter Vergleich beider Systeme vor, weil die Definition einheitlicher Trennfeldstärken ohne direkte elektrische Kontaktierung des Emitters im Serielles Modus nicht möglich ist.

Zu Beginn der Experimente in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie wurde die Notwendigkeit der Konditionierungsprozedur für optimale Analysenergebnisse nachgewiesen. Soll der Messdurchsatz zukünftig erhöht werden, besteht zur Automatisierung der Spülschritte Handlungsbedarf.

Neben der Feldstärke als wichtigem Optimierungsparameter stellt der Einsatz des hydrophilen Polymers Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) die wirkungsvollste Möglichkeit zur Verbesserung der Trennleistung dar. Sie beruht auf Unterdrückung des elektroosmotischen Flusses und der Verringerung von Analyt-Wand-Wechselwirkungen. Wird Systemstabilität vorausgesetzt, kann die Erhöhung der Trennfeldstärke zur Verbesserung der Trenneffizienz und Auflösung beitragen.

Ein sehr vielversprechender Ansatz ist die unterschiedliche Elektrolytzusammensetzung in der erweiterten Make-Up Flow Struktur zur unabhängigen Optimierung von elektrophoretischer Trennung und MS-Detektion. Verschiedene Anforderungen an Stofftrennung und Detektion begründen räumliche Trennung und prozessoptimierte Bedingungen und stellen die Vorstufe zur fortschreitenden Integration auf dem Gebiet der miniaturisierten Analysensysteme dar.

4.4 Anwendungen

Nachdem die Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (MCE-MS) zur Trennung und Detektion von Standardmolekülen erfolgreich angewendet und der Einfluss bestimmter Optimierungsparameter diskutiert wurde, soll die Technik für interessante Applikationen eingesetzt werden um das große Potential dieser miniaturisierten Analysetechnik aufzuzeigen.

4.4.1 Bestimmung der Flussrate

Aus der Kapillarelektrophorese (CE) und Mikrochipelektrophorese (MCE) ist die Bestimmung des elektroosmotischen Flusses (EOF) zur Unterscheidung kationischer und anionischer Analyten und zur Berechnung der Flussrate des verwendeten Trennsystems bekannt. Dabei werden zwei Methoden eingesetzt²⁵⁹. Steht die UV-Absorption zur Verfügung, bietet sich zur Analyse die Verwendung des ungeladenen Moleküls Dimethylsulfoxid (DMSO) an. Die Detektion des Neutralmarkers erfolgt bei $\lambda = 210$ nm nach einer bestimmten Zeit t , die dem EOF entspricht. Zur Bestimmung der Flussrate kann außerdem die Strommessmethode verwendet werden. Dabei werden 2 Elektrolyten unterschiedlicher Leitfähigkeit (verschiedene Konzentrationen) jeweils im BI-Vial sowie im Mikrofluidikkanal einschließlich BO-Vial vorgelegt. Elektrolyt bewegt sich als EOF vom BI- zum BO-Vial wobei sich der Strom linear verändert (Abnahme oder Zunahme). Haben sich die Elektrolyten komplett ausgetauscht, ändert sich der Strom nicht mehr. Aus der Länge des Kanals und der Zeit des Elektrolytaustausches kann durch Division die Wanderungsgeschwindigkeit des EOF bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Flussrate in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie sind beide beschriebenen Methoden ungeeignet. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein alternatives Verfahren angewendet. Nach Schmidt et al.¹⁵⁰ kann zur Bestimmung der Flussrate mittels MS-Detektion auf Verbindungen mit schwachem Säure-/Base-Charakter zurückgegriffen werden. Dabei wird die MS-Detektion der quasi-ungeladene Analytmoleküle erst durch die Assoziation von Natrium-Kationen während des Elektrosprayprozesses, außerhalb der Kanalstruktur ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Analyten entspricht der elektrolyt- und systemabhängigen elektroosmotischen Flussrate und der Sogwirkung des Massenspektrometers und beinhaltet keine elektrophoretische Komponente, wobei in dieser Arbeit das Disaccharid Maltose ($M = 342,3$ g/mol) verwendet wurde.

Die experimentelle Umsetzung zur Bestimmung der Flussrate in mikrofluidischen Systemen verdeutlicht Abb. 62. Dabei wird der Mikrochip mit MeOH/H₂O 30:70 (v/v) befüllt und 20 µM Maltose-Lösung am BI-Vial vorgelegt. Das Anlegen von 1,25 kV am BI-Vial gegenüber 0 kV am MS-Eingang induziert im Mikrofluidikkanal einen kathodischen EOF mit dem sich Maltose in Richtung Emitterspitze bewegt. Nach t = 2,5min kann das Disaccharid als Natrium-assoziiertes Massenpeak $[M+Na]^+ = 364,9$ im Anstieg des Totalionenstromes detektiert werden. Aus der ermittelten Wanderungsstrecke L = 7,5 cm und dem bekannten Querschnitt des verwendeten Mikrofluidikkanals ($A = 830 \mu\text{m}^2$)²⁶⁰ ergibt sich das Volumen mit $V = L \times A$ und damit die Flussrate $f = 25 \text{ nL}/\text{min}$ ($f = V/t$).

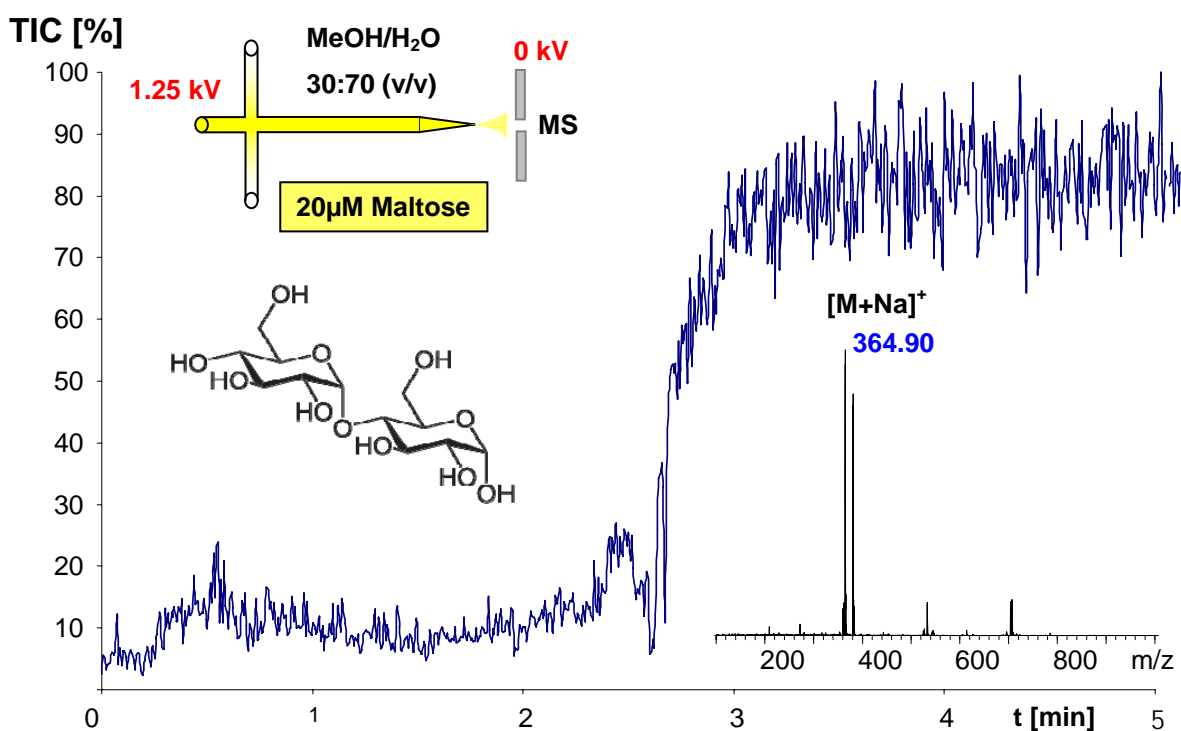


Abb. 62 Chip-MS-Detektion von Maltose als Natrium-assoziiertes Massenpeak zur Bestimmung der Flussrate in mikrofluidischen Systemen mit resultierendem Totalionenstrom und Massenspektrum (Beschreibung im Text)

Erfreulicher Weise steht der hier ermittelte Wert von $f = 25 \text{ nL}/\text{min}$ im Einklang mit Angaben in der Literatur. Wilm und Mann publizierten in ihrer Erstveröffentlichung¹⁴² über Nanoelektrospray den gleichen Wert. In einer nachfolgenden Arbeit gehen dieselben Autoren für die Flussraten von Nanoelektrospray von Werten zwischen 20-40 nL/min aus¹⁴³. Es bleibt anzumerken, dass zur Bestimmung der Flussrate in dieser Arbeit nur das Serielle Layout zum Einsatz kam. Interessant wäre auch die Verwendung des Make-Up Flow Designs mit direkter elektrischer Kontaktierung des Emitters.

4.4.2 Tryptischer On-Chip Verdau von Rinderserumalbumin

Der Nachweis und die Charakterisierung von Proteinen einschließlich ihrer post-translationalen Modifikationen (PTM), ist zentraler Bestandteil der modernen Bionalytik. Geringer Proben- und Reagenzienbedarf bei hohem Analysendurchsatz als vorteilhafte Eigenschaften miniaturisierter Analysensysteme prädestinieren ihren Einsatz auf diesem Gebiet^{261,262,263}. Zu diesem Zweck kann auf Erfahrungen makroskopischer Verfahren der Proteinanalyse zurück gegriffen werden. Abb. 63 gibt ein allgemeines Protokoll zur Identifikation von Proteinen mittels MS-Detektion nach C. Dass²⁶⁴ wieder.

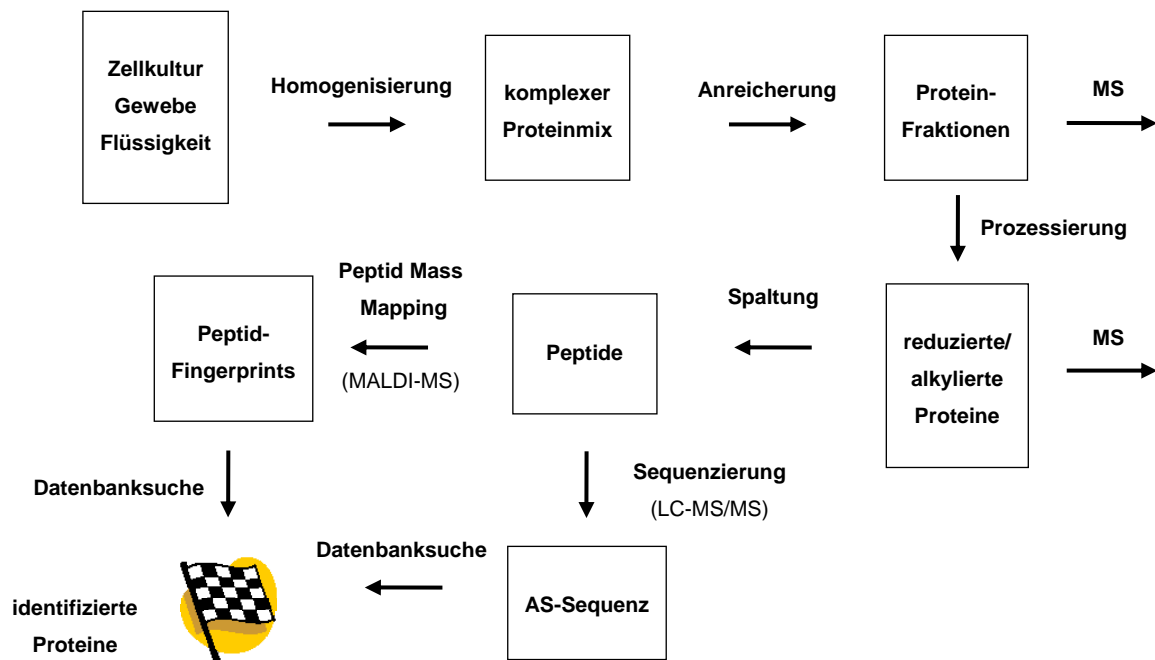


Abb. 63 Allgemeines Protokoll zur Identifikation von Proteinen mittels MS-Detektion nach C. Dass²⁶⁴

Am Anfang der Prozedur steht in der Homogenisierung die Freisetzung des Proteingemisches aus biologischem Material (Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung oder Lysepuffer). Der zweite Schritt der Proteinanreicherung hat große Bedeutung für die Analyse, da die nachzuweisenden Proteine in den meisten Fällen nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Die Prozessierung löst die native Struktur der Proteine auf und macht sie der enzymatischen oder chemischen Spaltung in Peptide zugänglich. Diese werden direkt oder nach chromatographischer Trennung massenspektrometrisch detektiert und können mit Hilfe von Datenbanken Proteinen zugeordnet werden (Identifikation). Für alle Prozessschritte steht ein breites Methodenspektrum für mikrofluidische Applikationen zur Verfügung¹⁶.

Ziel der Entwicklung ist die vollständige Implementierung aller notwendigen Teilschritte zur kompletten Proteinanalyse mit Hilfe von Mikrochips. Dabei sei darauf hingewiesen, dass sich die MS-Detektion nicht nur auf die Analyse enzymatischer Reaktionen beschränkt. Sie bietet außerdem die Möglichkeit vielfältige chemische Reaktionen in mikrofluidischen Strukturen *online* zu analysieren²⁶⁵. Im dargestellten Experiment (Abb. 64) wurden Substrat (Rinderserumalbumin-BSA) und Enzym (Trypsin) in gegenüberliegenden Vials (SI und SO) vorgelegt und die mikrofluidische Kanalstruktur mit 2mM NH₄HCO₃ und 25 Vol% MeOH befüllt. Nach Anlegen von je 1,2 kV an SI-SO Vials bewegen sich die Reaktionspartner aufgrund von Elektroosmose und Elektrophorese in Richtung Chip-Spitze, werden über Nanoelektrospray ionisiert und im Massenspektrometer detektiert. Nach ca. 3 Minuten lässt sich ein deutlicher Anstieg des Totalionenstromes (TIC) beobachten. Dieser resultiert aus den Reaktionsprodukten. Extrahierte Massenspektren konnten mit Hilfe einer frei zugänglichen Datenbank²⁶⁶ des EMBL-Heidelberg (*European Molecular Biology Laboratory*) charakteristischen Peptidfragmenten zugeordnet werden und ermöglichen damit die nachträgliche Identifizierung des BSA. In Zukunft sollen die Peptide des tryptischen Proteinverdaues vor der MS-Detektion elektrophoretisch aufgetrennt werden um bessere Auflösungen zu erzielen. Dies erscheint vor allem im Hinblick geplanter Analysen von Realproben unbedingt notwendig.

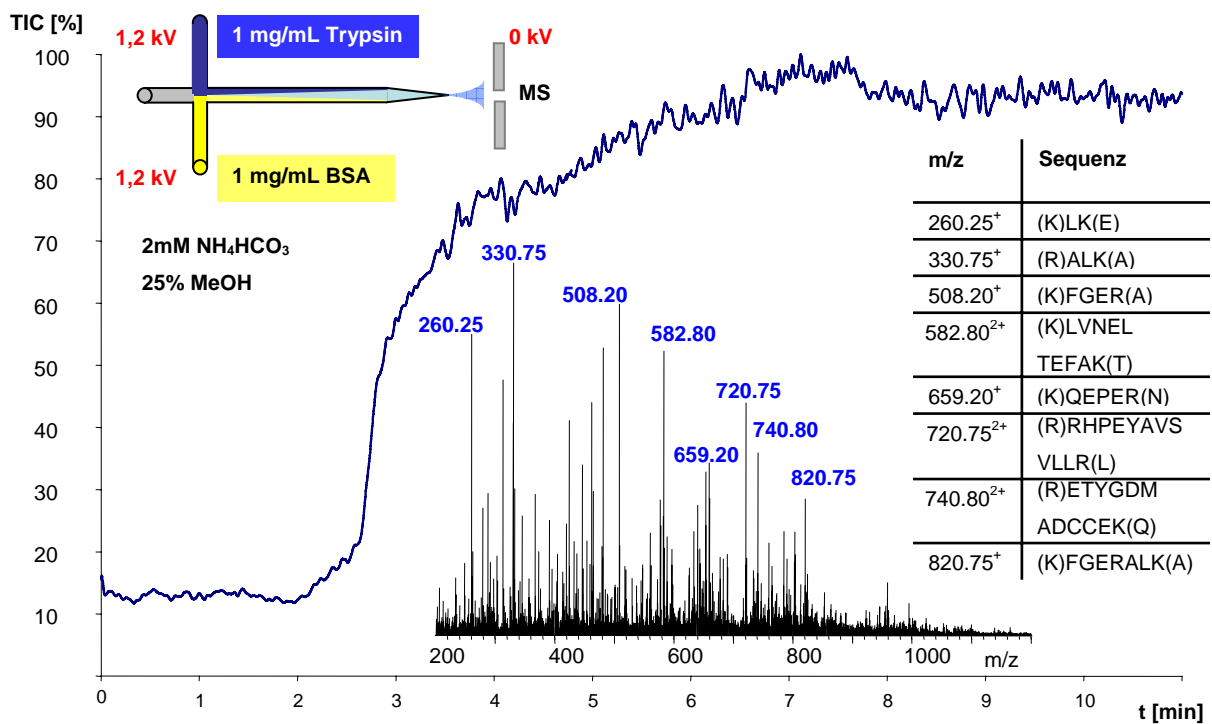


Abb. 64 Tryptischer *On-Chip* Verdau von Rinderserumalbumin (BSA) mit MS-Detektion und datenbankgestützte Zuordnung dominanter Signale zu entsprechenden Peptiden (Beschreibung im Text)

4.4.3 Ultraschnelle Trennungen

Wesentlicher Vorteil der Mikrochipelektrophorese (MCE) gegenüber der Kapillarelektrophorese (CE) ist die drastische Verringerung der Analysenzeiten durch verkürzte Trennstrecken und hohe Feldstärken. Wird zur Gewinnung zusätzlicher Strukturinformation die massenspektrometrische Detektion angestrebt, sind schnelle Massenanalytoren zwingend erforderlich. Folgendes Rechenbeispiel verdeutlicht den Sachverhalt. Eine Trennung mit der MCE soll 10 s dauern und 3 Analyten mit durchschnittlichen Peakbreiten von 0,5 s beinhalten. Bietet ein Quadrupol-MS eine Scanrate von 10 Hz können nur 5 Datenpunkte pro Peak generiert werden. Mittels Time of Flight-MS (ToF-MS) mit 100 Messungen/Sekunde könnten dagegen 50 Datenpunkte pro Peak aufgenommen werden. Günstiger Weise stand während dieser Arbeit ein schnelles ToF-MS (S. 46 - 3.2.2) zur Verfügung, so dass zusammen mit einer extrem verkürzten Trennstrecke von nur noch 18 mm (Abb. 65) ultraschnelle Analysen durchgeführt werden konnten.

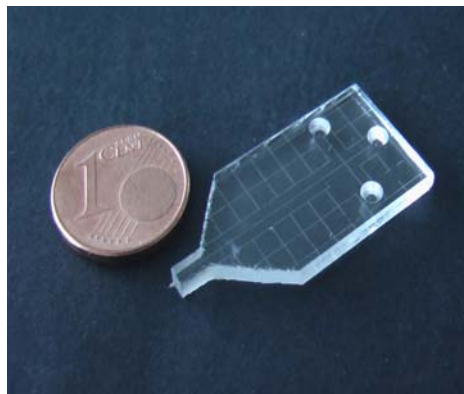


Abb. 65 Chip für ultraschnelle Analysen in der Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie (Innendurchmesser der Emitterspitze i. d. = 10 μm / Trennstrecke $L = 18 \text{ mm}$)

Als Alternative zur neuen, noch wenig verbreiteten MCE-MS kann zur Durchführung schnellster Analysen auch auf die weitaus etabliertere CE-MS zurückgegriffen werden. Matysik et al.²⁶⁷ stellten vor kurzem ein Setup im Sheat-Flow-Design mit einer 28 cm langen Kapillare und sehr hohen Feldstärken bis 1,07 kV/cm (38,3 μA) vor. Die Bedingungen erlauben die Trennung und Detektion der Modellsubstanzen Metformin und Histidin in weniger als 35 s. Außerdem konnten die Wissenschaftler mit ihrer Konfiguration spezifische Peptide eines tryptischen BSA-Verdaues innerhalb von 2 min auftrennen und nachweisen. Die dabei erzielten Auflösungen sind mit Ergebnissen konventioneller CE-MS vergleichbar²⁶⁸. Vor allem im Hinblick auf bioanalytische Fragestellungen mit hohem Probendurchsatz ist die ultraschnelle CE-MS mit verkürzten Kapillaren und hohen Feldstärken nach Meinung der Autoren aufgrund effizienterer Injektionen und guter Handhabbarkeit besser geeignet als die MCE-MS.

Im ersten Beispiel der ultraschnellen Analysen wird die Anzahl der MS-Messungen/Sekunde und ihr Einfluss auf die Peakbreite diskutiert. Spermidin (200 µg/mL) und Arginin (50 µg/mL) als Testsubstanzen wurden in wässriger 0,1 Vol%-iger Essigsäurelösung mittels hoher angelegter Spannungen (SI-SO/BI-Vials-7.5/10kV) aufgetrennt und detektiert. Im verwendeten seriellen Layout kann kein Elektrospraypotential am Emitter definiert werden. Würde man hypothetisch einen Wert von 1 kV voraussetzen, ergäbe sich eine exorbitante Trennfeldstärke von 3,7 kV/cm. Abb. 66 zeigt die extrahierten Massenspuren von Spermidin und Arginin, die mit 12,5/25/50/100 MS-Messungen/Sekunde am Leco ToF-MS aufgenommenen wurden.

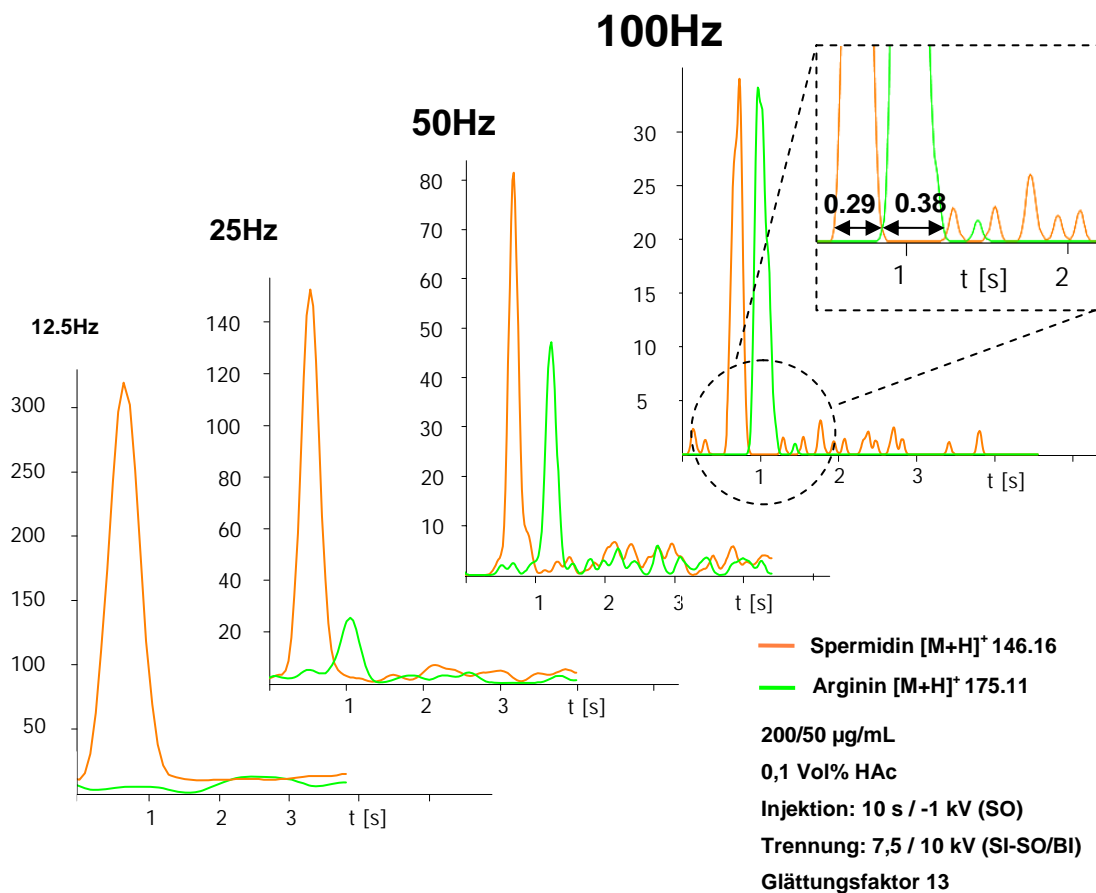


Abb. 66 Ultraschnelle Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie-Analyse von Spermidin und Arginin mit unterschiedlicher Anzahl von MS-Messungen/Sekunde und ihr Einfluss auf die Peakbreite der Analyten

Abb. 66 veranschaulicht das anfangs vorgestellte Rechenbeispiel eindrucksvoll. Wird mit 12,5 Messungen/Sekunde detektiert, resultieren wenige Datenpunkte hoher Intensität pro Peak. Im Ergebnis generiert die Software (Glättungsfaktor 13) für Spermidin eine Peakbreite von ungefähr 1 s. Arginin ist dagegen nur extrem schwach erkennbar. Die höchst mögliche Anzahl von 100 MS-Messungen/Sekunde liefert für beide Analyten sehr schmale Peaks von nur 0,29- / 0,38 s mit

geringerer Intensität. Soweit bekannt stellt unser Experiment mit einer Migrationszeit von 1,3 s zum gegenwärtigen Zeitpunkt die schnellste Trennung in flüssiger Phase mit MS-Detektion dar. Das zweite Beispiel zeigt die ultraschnelle Trennung und MS-Detektion von basischem Arginin (50 µg/mL) und Nicotinsäure (200 µg/mL) in 2,3 s. Dabei wurde Ammoniumacetatlösung (2,5 mM mit 12,5 Vol% MeOH) als Elektrolyt eingesetzt. Die Probeninjektion erfolgt innerhalb von 10s durch -1 kV angelegter Spannung am SO-Vial, während an allen anderen Vials 0 kV appliziert wurde. Gegenüber der ersten Trennung (Spermidin und Arginin) wurden in der Trennphase dieses Experiments nochmals deutlich höhere Spannungen an SI-SO/BI Vials (10 / 17,5 kV) angelegt. Abb. 67 zeigt die Basislinientrennung der Modellsubstanzen als extrahierte Massenspuren sowie ihre Massenspektren.

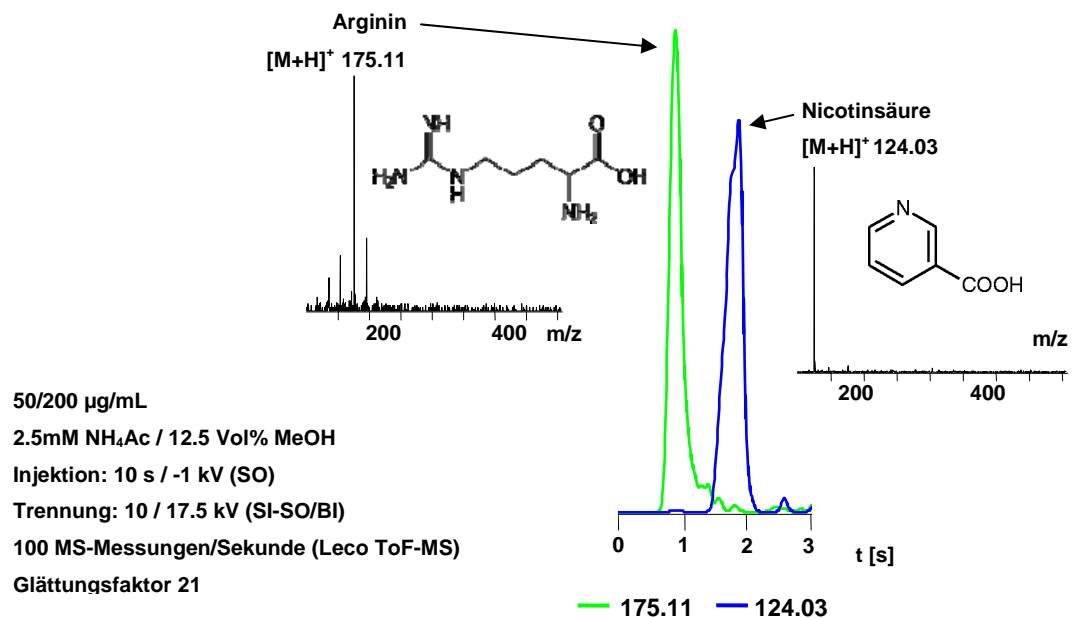


Abb. 67 Ultraschnelle Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie von Arginin und Nicotinsäure (extrahierte Massenspuren und Massenspektren)

Alle im Rahmen der ultraschnellen Trennungen vorgestellten Experimente dienen lediglich zur Demonstration der Machbarkeit und weisen erhebliches Optimierungspotential auf. Neben der Überwindung der Bandenverbreiterung aufgrund unzureichender Injektion im seriellen Layout durch Verwendung des Make-Up Flow Designs bietet sich zur Steigerung der Trenneffizienz vor allem der Einsatz von HPMC als Kapillar-Beschichtung an. Unter den gegebenen Bedingungen ist eine weitere Erhöhung der Trennfeldstärke nicht ohne weiteres möglich. Sie setzt die Verbesserung des Versuchsaufbaus voraus, da momentan in regelmäßigen Abständen Kurzschlussströme an den Kontaktstellen der Spannungsversorgung beobachtet wurden, die in Zukunft vermieden werden müssen.

Im dritten Beispiel wird die bis zum jetzigen Zeitpunkt schnellste bekannte Peptidtrennung mit MS-Detektion von Bradykinin (50 µg/mL) und Gramicidin (200 µg/mL), dessen D Form detektiert wird, innerhalb von 5 s vorgestellt. Im Vergleich zur Arginin-Nicotinsäure-Trennung wurden hier Konzentration und organischer Anteil des Elektrolyten verdoppelt (5 mM NH₄Ac/25 Vol% MeOH) und während der Trennung deutlich moderatere Spannungen von 5 kV (SI-SO) und 7,5 kV (BI) angelegt. Im Gegensatz zu den bisherigen Beispielen gibt Abb. 68 nicht die extrahierten Massenspuren (MIC) sondern den Totalionenstrom (TIC) wieder.

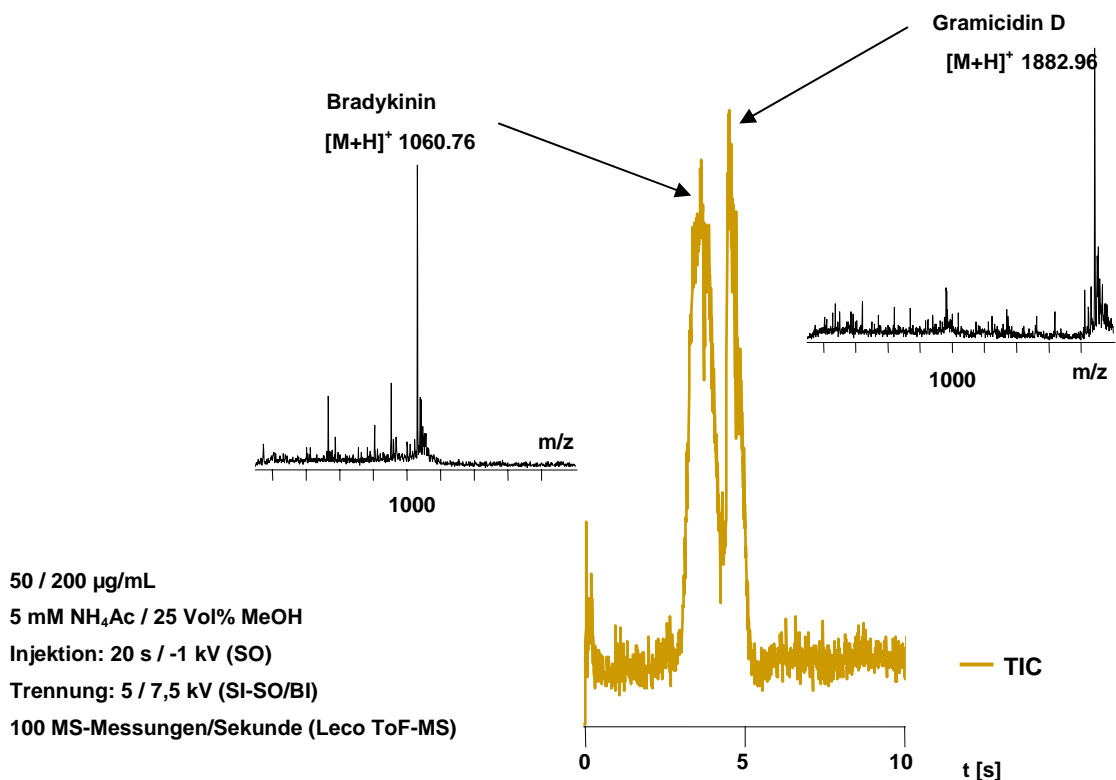


Abb. 68 Ultraschnelle Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie von Bradykinin und Gramicidin

Wie die aufgeführten Beispiele eindrucksvoll zeigen, konnten mittels Mikrochipelektrophorese-Massenspektrometrie erfolgreich ultraschnelle Analysen durchgeführt werden. Zukünftig bieten Chips im Make-Up Flow Layout und Kapillar-Beschichtungen mit HPMC weiteres Optimierungspotential. Ein Schwachpunkt in der aktuellen Durchführung stellt die zeit-, und arbeitsintensive Prozedur zur Konditionierung der Chips dar. Aufwendige Spülprotokolle entsprechen langen Rüstzeiten und sind vor dem Hintergrund schneller Trennungen im Sekunden oder Subsekundenbereich inakzeptabel. Im Sinne einer praxistauglichen Anwendung besteht Automatisierungspotential. Langfristig wären preiswerte Einwegchips (*Disposables*) eine vielversprechende Alternative, weil konstante Oberflächeneigenschaften gewährleistet und Kreuzkontaminationen vermieden werden könnten.

5 Zusammenfassung

Die Arbeit behandelt die erste totvolumenfreie Kopplung von Mikrochipelektrophorese (MCE) und Nanoelektrospray-Massenspektrometrie (nanoES-MS) mit Glas als Chipsubstrat.

Grundlage dafür ist die Verfügbarkeit reproduzierbar herzustellender, monolithisch integrierter Emittter. Zu diesem Zweck wurde ein dreistufiges Herstellungsverfahren aus Mikrofräsen, Spitze ziehen und Ätzen mit Flusssäure entwickelt. Der Fertigungsprozess stellt die exakte zentrische Positionierung des Mikrofluidikkanals in der Spitze sicher und ermöglicht die Fabrikation von Emitttern mit definierten Abmessungen. Von großer Bedeutung ist dabei die Reduzierung der Wandstärke, die der drastischen Verringerung der Emittterfläche entspricht, so dass Totvolumen praktisch nicht mehr auftritt.

Am Beginn der experimentellen Arbeiten steht die Untersuchung der massenspektrometrischen Sprayeigenschaften (Signalintensität, rel. Standardabweichung und Signal/Rausch-Verhältnis) des Chip-Emitters im Vergleich zu kommerziellen Nanospray-Nadeln. Mit Ephedrin als Testsubstanz konnte für beide Interface-Konfigurationen (Chip-Emittter und Nanospray-Nadel) ein optimaler Emittter-Innendurchmesser von 10 μm identifiziert werden.

Schwerpunkt in der Darstellung der Ergebnisse ist der erfolgreiche Einsatz des neuen Emitters zur totvolumenfreien Kopplung von Mikrochipelektrophorese und Massenspektrometrie (MCE-MS). Dafür wurden zwei Testgemische aus Amilorid, Leucin-Enkephalin, Bendroflumethiazid und Bumetanid sowie Spermin, Arginin und Nicotinamid eingeführt. Die Trennungsoptimierung erfolgte zusätzlich mit Kapillarelektrophorese und Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie. Abschließend werden Anwendungen vorgestellt, die das große Potential der neuen Chip-MS-Kopplung verdeutlichen sollen. Die gezeigte *Online*-Analyse eines tryptischen Proteinverdaues könnte Ausgangspunkt zukünftiger Entwicklungen auf dem Gebiet der Bioanalytik sein und ultraschnelle Trennungen mit MS-Detektion unterstreichen den Anspruch zur Etablierung hocheffizienter, miniaturisierter Hochdurchsatzscreening-Systeme.

Zentrales Anliegen künftiger Arbeiten in der MCE-MS muss die Erhöhung der Trenneffizienz sein. Der Einsatz von Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) als Kapillarwand-Beschichtung bietet sich dafür an. Besonders vielversprechend erscheint außerdem die Anwendung von Mikrochips im Make-Up Flow Layout. Sie ermöglichen die direkte elektrische Kontaktierung des Emitters, die Definition einheitlicher Feldstärken und individuelle Elektrolytzusammensetzungen in den Mikrofluidikkanälen zur Optimierung der elektrophoretischen Trennung und MS-Detektion. Ein eigener Prototyp konnte hier bereits erfolgreich eingesetzt werden. Langfristig eröffnet die neue Kopplungstechnik faszinierende Möglichkeiten zur massenspektrometrischen Detektion von chemischen Reaktionen im Rahmen von *lab-on-a-chip* Systemen.

6 Literaturverzeichnis

- ¹ A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer, *Sensors and Actuators B* **1990**, 1, 244–248
- ² P. S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3887–3907
- ³ J. West, M. Becker, S. Tombrink, A. Manz, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 4403–4419
- ⁴ G. M. Whitesides, *NATURE* **2006**, 442, 368–373
- ⁵ M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser, *Nature Biotechnology* (1996)14 (1): 61–6
- ⁶ S. Fields, *Science* **2001**, 291, 1221–1224
- ⁷ M. Tyers, M. Mann, *NATURE* **2003**, 422, 193–197
- ⁸ S. Hanash, *NATURE* **2003**, 422, 226–232
- ⁹ J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt et al., *Science* **2001**, 291, 1304–1351
- ¹⁰ P. James, *Quarterly reviews of biophysics* **1997**, 30, 279–331
- ¹¹ P. Kündig, *Science* **2006**, 314, 430–431
- ¹² A. J. deMello, *NATURE* **2003**, 422, 394–402
- ¹³ W. Hellmich, C. Pelargus, K. Leffhalm, A. Ros, D. Anselmetti, *Electrophoresis* **2005**, 26, 3689–3696
- ¹⁴ J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *NATURE* **2003**, 422, 403–411
- ¹⁵ R. Aebersold, M. Mann, *NATURE* **2003**, 422, 198–207
- ¹⁶ S. L. S. Freire, A. R. Wheeler, *Lab Chip* **2006**, 6, 1415–1423
- ¹⁷ E. R. Badman, R. Graham Cooks, *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 659–671
- ¹⁸ L. Gao, Q. Song, G. E. Patterson, R. G. Cooks, Z. Ouyang, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5994–6002
- ¹⁹ S.C. Terry, J.H. Jerman, J.B. Angell, *IEEE Trans. Electron Devices* **1979**, 26, 1880–1886
- ²⁰ A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, K. Sato, *Sensors and Actuators B* **1990**, 1, 249–255
- ²¹ <http://www.halbleiter.org/lithografie/> Stand April **2009**
- ²² A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte, J. C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi, H. M. Widmer, *Journal of Chromatography A*, **1992**, 593, 253–258
- ²³ Y. Peng, A. Pallandre, N. T. Tran, M. Taverna, *Electrophoresis* **2008**, 29, 157–178
- ²⁴ R. Sinville, S. A. Soper, *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 1714–1728
- ²⁵ M. Pumera, *Electrophoresis* **2008**, 29, 269–273
- ²⁶ K. Faure, M. Pravda, J. D. Glennon, *Analytical Letters* **2006**, 39, 435–449
- ²⁷ J. S. Mellors, V. Gorbounov, R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 6881–6887
- ²⁸ H. Becker, G. Gärtner, *Electrophoresis* **2000**, 21, 12–26
- ²⁹ H. Becker, L. E. Locascio, *Talanta* **2002**, 56, 267–287
- ³⁰ J. M. K. Ng, I. Gitlin, A. D. Stroock, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* **2002**, 23, 3461–3473
- ³¹ S. K. Sia, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3563–3576
- ³² L. Gitlin, P. Schulze, Detlev Belder, *Lab Chip* **2009** Ref.: B904684D
- ³³ V. Dolnik, *Electrophoresis* **2008**, 29, 143–156
- ³⁴ A. Gaspar, M. Englmann, A. Fekete, M. Harir, P. Schmitt-Kopplin, *Electrophoresis* **2008**, 29, 66–79
- ³⁵ M. Gilges, M. H. Kleemiß, G. Schomburg, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2038–2046
- ³⁶ D. Belder, D. Stöckigt, *Journal of Chromatography A*, **1996**, 752, 271–277

-
- ³⁷ D. Belder, A. Deege, H. Husmann, F. Kohler, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2001**, 22, 3813–3818
- ³⁸ D. Belder, A. Deege, F. Kohler, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2002**, 23, 3567–3573
- ³⁹ D. Belder, F. Kohler, M. Ludwig, K. Tolba, N. Pichl, *Electrophoresis* **2006**, 27, 3277–3283
- ⁴⁰ M. Ludwig, D. Belder, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2481–2486
- ⁴¹ D. Belder, M. Ludwig *Electrophoresis* **2003**, 24, 3595–3606
- ⁴² J. Liu, M. L. Lee, *Electrophoresis* **2006**, 27, 3533–3546
- ⁴³ M. M. Hsieh, T.C. Chiu, W. L. Tseng, H. T. Chang, *CURRENT ANALYTICAL CHEMISTRY* **2006**, 2, 17–33
- ⁴⁴ D. Belder, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2422–2430
- ⁴⁵ M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3233–3238
- ⁴⁶ N. Pichl, M. Ludwig, D. Belder, *Electrophoresis* **2004**, 25, 3848–3852
- ⁴⁷ D. Belder, M. Ludwig, L. W. Wang, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2463–2466
- ⁴⁸ R. Holze „Leitfaden der Elektrochemie“ *Teubner Verlag* **1998** / ISBN 3519035472
- ⁴⁹ O. Geschke, H. Klank, P. Tellemann „Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices“ *Wiley-VCH* **2004** / ISBN 3527307338
- ⁵⁰ V. Ribitsch, C. Jorde, J. Schurz, H. J. Jakobasch, *Colloid & Polymer Sci.* **1988**, 77, 49-54.
- ⁵¹ L. S. Ettre, *Pure & Appl. Chem.*, **1993**, 65, 4, 819–872
- ⁵² J. C. Giddings, *SEPARATION Science* **1969**, 4, 181–189
- ⁵³ <http://www.micronit.com> / Stand April **2009**
- ⁵⁴ <http://www.micralyne.com> / Stand April **2009**
- ⁵⁵ S. K. Griffiths, R. H. Nilson, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 272–278
- ⁵⁶ J. I. Molho, A. E. Herr, B. P. Mosier, J. G. Santiago, T. W. Kenny, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1350–1360
- ⁵⁷ S. V. Ermakov, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3512–3517
- ⁵⁸ J. Han, A. K. Singh, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1049, 205–209
- ⁵⁹ H. Nagata, M. Tabuchi, K. Hirano, Y. Baba *Electrophoresis* **2005**, 26, 2687–2691
- ⁶⁰ E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, M. T. Galceran, *Electrophoresis* **2004**, 25, 1927–1948
- ⁶¹ K. W. Ro, R. Nayak, D. R. Knapp, *Electrophoresis* **2006**, 27, 3547–3558
- ⁶² F. Kitagawa, K. Otsuka, *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 794–802
- ⁶³ G. T. Roman, S. Carroll, K. McDaniel, C. T. Culbertson, *Electrophoresis* **2006**, 27, 2933–2939
- ⁶⁴ M. Y. Badal, M. Wong, N. Chiem, H. Salimi-Moosavi, D. J. Harrison, *J. Chromatogr. A* **2002**, 947, 277–286
- ⁶⁵ W. Tan, Z. H. Fan, C. X. Qiu, A. J. Ricco, I. Gibbons, *Electrophoresis* **2002**, 23, 3638–3645
- ⁶⁶ N. Gottschlich, S. C. Jacobson, C. T. Culbertson, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2669–2674
- ⁶⁷ R. D. Rocklin, R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5244–5249
- ⁶⁸ J. D. Ramsey, S. C. Jacobson, C. T. Culbertson, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3758–3764
- ⁶⁹ M. A. Schwarz, P. C. Hauser, *Lab Chip* **2001**, 1, 1–6
- ⁷⁰ J. R. Krogmeier, I. Schaefer, G. Seward, G. R. Yantza, J. W. Larsona, *Lab Chip* **2007**, 7, 1767–1774
- ⁷¹ P. S. Dittrich, A. Manz *Anal Bioanal Chem* **2005**, 382, 1771–1782
- ⁷² M. E. Johnson, James P. Landers, *Electrophoresis* **2004**, 25, 3513–3527
- ⁷³ S. Götz, U. Karst, *Anal Bioanal Chem* **2007**, 387, 183–192
- ⁷⁴ B. C. Giordano, L. Jin, A. J. Couch, J. P. Ferrance, J. P. Landers, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4705–4714
- ⁷⁵ R. S. Foote, J. Khandurina, S. C. Jacobson, J. Michael Ramsey, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 57–63

-
- ⁷⁶ C. Das, Z. H. Fan, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 3619–3626
- ⁷⁷ M. A. McClain, C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, N. L. Allbritton, C. E. Sims, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5646–5655
- ⁷⁸ <http://www.dsmz.de> / Stand April **2009**
- ⁷⁹ B. I. Sadowich, I. Fadl, C. Burns, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 2368–2378
- ⁸⁰ J. Zhang, M. Gassmann, W. He, F. Wan, B. Chu, *Lab Chip*, **2006**, *6*, 526–533
- ⁸¹ M. Funes-Huacca, L. Correia de Almeida Regitano, O. Mueller, E. Carrilho, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3860–3864
- ⁸² D. Belder, A. Deege, M. Maass, Martin Ludwig, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2355–2361
- ⁸³ J. Han, A. K. Singh, *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1049* 205–209
- ⁸⁴ H. Nagata, M. Tabuchi, K. Hirano, Y. Baba, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2247–2253
- ⁸⁵ A. Pais, A. Banerjee, D. Klotzkin, I. Papautsky, *Lab Chip*, **2008**, *8*, 794–800
- ⁸⁶ B. Yao, H. Yang, Q. Liang, G. Luo, L. Wang, K. Ren, Y. Gao, Y. Wang, Y. Qiu, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5845–5850
- ⁸⁷ Persönliche Kommunikation mit P. Schulze / **März 2009**
- ⁸⁸ W. Hellmich, D. Greif, C. Pelargus, D. Anselmetti, A. Ros, *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1130*, 195–200
- ⁸⁹ P. Schulze, M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1325–1329
- ⁹⁰ P. Schulze, M. Ludwig, D. Belder, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 4894–4899
- ⁹¹ P. Schulze, M. Schüttelpelz, M. Sauer, D. Belder, *Lab Chip*, **2007**, *7*, 1841–1844
- ⁹² P. Schulze, D. Belder, *Anal Bioanal Chem.* **2009**, *393*, 515–525
- ⁹³ W. R. Vandaveer IV, S. A. Pasas, R. S. Martin, S. M. Lunte, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3667–3677
- ⁹⁴ F. M. Matysik, *Microchim Acta* **2008**, *160*, 1–14
- ⁹⁵ L. Nyholm, *Analyst*, **2005**, *130*, 599–605
- ⁹⁶ R. P. Baldwin, T. J. Roussel, Jr, M. M. Crain, V. Bathlagunda, D. J. Jackson, J. Gullapalli, J. A. Conklin, R. Pai, J. F. Naber, K. M. Walsh, R. S. Keynton, *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 3690–3697
- ⁹⁷ C.-C. Wu, R.-G. Wu, J.-G. Huang, Y.-C. Lin, H.-C. Chang, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 947–952
- ⁹⁸ P. Ertl, C. A. Emrich, P. Singhal, R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 3749–3755
- ⁹⁹ D. J. Jackson, J. F. Naber, T. J. Roussel, Jr, M. M. Crain, K. M. Walsh, R. S. Keynton and R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 3643–3649.
- ¹⁰⁰ J. Wang, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1133–1140
- ¹⁰¹ A. T. Woolley, K. Lao, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 684–688
- ¹⁰² G. Chen, Y. Lin, J. Wang, *Talanta*, **2006**, *68*, 497–503
- ¹⁰³ W. R. Vandaveer IV, S. A. Pasas-Farmer, D. J. Fischer, C. N. Frankenfeld, S. M. Lunte, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3528–3549
- ¹⁰⁴ M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S. M. Ford, S. Llopis, R. L. McCarley, S. A. Soper, *Anal. Chem.*, **2004**, *74*, 2407–2415
- ¹⁰⁵ M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301
- ¹⁰⁶ J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64–71
- ¹⁰⁷ C. Campa, A. Coslovi, A. Flamigni, M. Rossi, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2027–2050
- ¹⁰⁸ C. W. Huck, R. Bakry, L. A. Huber, G. K. Bonn, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2063–2074
- ¹⁰⁹ C. W. Klampfl, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 3–34
- ¹¹⁰ R. A. Everley, T. R. Croley, *Journal of Chromatography A*, **2008**, *1192*, 239–247
- ¹¹¹ B. Timischl, K. Dettmer, H. Kaspar, M. Thieme, P. J. Oefner, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 2203–2214

-
- ¹¹² F. Meng, A. J. Forbes, L. M. Miller, N. L. Kelleher, *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, 24, 126–134
- ¹¹³ G. Scherperel, G. E. Reid, *Analyst* **2007**, 132, 500–506
- ¹¹⁴ A. S. Fandiño, I. Rais, M. Vollmer, H. Elgass, H. Schägger, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, 1223–1231
- ¹¹⁵ J. Zeleny, *Phys. Rev.* **1914**, 3, 69–91
- ¹¹⁶ J. Zeleny, *Phys. Rev.* **1917**, 10, 1–6
- ¹¹⁷ M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240–2249
- ¹¹⁸ M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4451–4459
- ¹¹⁹ M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4671–4675
- ¹²⁰ M. L. Aleksandrov, L. N. Gall, N. V. Krasnov, V. I. Nikolayev, V. A. Pavlenko, V. A. Shkurov, *Dokl Akad Naut*, **1984**, 277, 389–383
- ¹²¹ S. Kromidas „HPLC-Tipps Band 2“ *Hoppenstedt Publishing* **2004** / ISBN 3935772076
- ¹²² T. C. Rohner, N. Lion, H. H. Girault, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 3056–3068
- ¹²³ D. P. H. Smith, *IEEE Trans. Ind. Appl.* **1986**, IA-22, 527–535
- ¹²⁴ G. Taylor, *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* **1964**, 280, 383–397
- ¹²⁵ M. G. Ikonomou, A. T. Blades, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1989–1998
- ¹²⁶ F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.) „Bioanalytik“ *Spektrum Akademischer Verlag* **1998** / ISBN 3827400414
- ¹²⁷ Lord Rayleigh, *Philos. Mag.* **1882**, 14, 184–186
- ¹²⁸ L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 972A–986A
- ¹²⁹ A. Gomez, K. Tang, *Phys. Fluids* **1994**, 6, 405–414
- ¹³⁰ M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240–2249
- ¹³¹ G. Schmelzeisen-Redeker, L. Battering, F. W. Röllgen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1989**, 90, 139–150
- ¹³² J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2287–2294
- ¹³³ B. A. Thomson, J. V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4451–4463
- ¹³⁴ J. F. de la Mora, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 93–104
- ¹³⁵ P. Pan, S. A. McLuckey, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5468–5474.
- ¹³⁶ J. B. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 524–535
- ¹³⁷ H. Stutz, *Electrophoresis* **2005**, 26, 1254–1290
- ¹³⁸ M. Moini, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 466–480
- ¹³⁹ C. Kee Lim, G. Lord, *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 547–557
- ¹⁴⁰ G. Chen, B. N. Pramanik, Y. H. Liu, U. A. Mirza, *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, 279–287
- ¹⁴¹ M. R. Emmett, R. M. Caprioli, *J. Am Soc Mass Spectrom* **1994**, 5, 605–613
- ¹⁴² M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, 136, 167–180
- ¹⁴³ M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1–8
- ¹⁴⁴ R. J. Pfeifer, C. D. Hendricks, *ALAA J.* **1968**, 6, 496–502
- ¹⁴⁵ P. Kebarle, Y. Ho “On the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. B. Cole (Ed.) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry – Fundamentals, Instrumentation, and Applications*” *John Wiley & Sons* **1997** / ISBN 0471145645
- ¹⁴⁶ J. Fernandez de la Mora, I. G. Loscertales, *J. Fluid Mech.* **1994**, 260, 155–184.
- ¹⁴⁷ M. Karas, U. Bahr, T. Dülcks, *Fresenius J Anal Chem* **2000**, 366, 669–676
- ¹⁴⁸ R. Juraschek, T. Dülcks, M. Karas, *J Am Soc Mass Spectrom* **1999**, 10, 300–308
- ¹⁴⁹ U. Bahr, A. Pfenninger, M. Karas, B. Stahl, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4530–4535

-
- 150 A. Schmidt, M. Karas, Thomas Dülcks, *J. Am Soc Mass Spectrom* **2003**, 14, 492–500
- 151 S. Chen, *Proteomics* **2006**, 6, 16–25
- 152 T. Köcher, G. Allmaier, M. Wilm, *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38, 131–137
- 153 P. Pan, H. P. Gunawardena, Y. Xia, S. A. McLuckey, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1165–1174
- 154 U. Bahr, M. Karas „Massenspektrometrie Tutorial“ *Inst. f. Pharm. Chemie / Universität Frankfurt a. Main* **2009**
- 155 B. Domon, R. Aebersold, *Science* **2006**, 312, 212–217
- 156 E. de Hoffmann, V. Stroobant „Mass Spectrometry - Principles and Applications“ *Wiley-VCH* **2007** / ISBN 9780470033104
- 157 W. Paul, H. Steinwedel., *Z. Naturforsch.* **1953**, 8a, 448
- 158 R. E. Finnigan, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 969A–975A
- 159 <http://www.chemgapedia.de> /Stand April **2009**
- 160 <http://www.shimadzu.de> / Stand April **2009**
- 161 W. Stephens, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 691
- 162 W. C. Wiley, J.B. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, 26, 1150–1157
- 163 M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 2935–2939
- 164 K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *RCMS* **1988**, 2, 151–153
- 165 B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin, *Sov. Phys. JETP* **1973**, 37, 45
- 166 J. H. Gross „Mass Spectrometry – A Textbook“ *Springer-Verlag* **2004** / ISBN 3540407391
- 167 R. S. Brown, J. J. Lennon, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3990–3999
- 168 M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin, *RCMS*, **1995**, 1044–1050
- 169 W. C. Sung, H. Makamba, S. H. Chen, *Electrophoresis* **2005**, 26, 1783–1791
- 170 F. Foret, P. Kusy, *Electrophoresis* **2006**, 27, 4877–4887
- 171 I. M. Lazar, J. Grym, F. Foret, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, 25, 573–594
- 172 S. Koster, E. Verpoorte, *Lab Chip* **2007**, 7, 1394–1412
- 173 A. D. Zamfir, L. Bindila, N. Lion, M. Allen, H. H. Girault, J. Peter-Katalinic, *Electrophoresis* **2005**, 26, 3650–3673
- 174 R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1174–1178
- 175 Q. Xue, F. Foret, Y. M. Dunayevskiy, P. M. Zavracky, N. E. McGruer, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 426–430
- 176 Y. X. Wang, J. W. Cooper, C. S. Lee, D. L. DeVoe, *Lab Chip*, **2004**, 4, 363–367
- 177 T. Koerner, R. D. Oleschuk, *RCMS* **2005**, 19, 3279–3286
- 178 I. M. Lazar, L. Li, Y. Yang, B. L. Karger, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3655–3662
- 179 D. Figeys, Y. Ning, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3153–3160
- 180 I. M. Lazar, R. M. Ramsey, J. M. Ramsey, *Anal. Chem* **2001**, 73, 1733–1739
- 181 C. Wang, R. Oleschuk, F. Ouchen, J. Li, P. Thibault, D. J. Harrison, *RCMS* **2000**, 14, 1377–1383
- 182 Y. Deng, J. Henion, J. Li, P. Thibault, C. Wang, D. J. Harrison, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 639–646
- 183 E. X. Vrouwe, J. Gysler, U. R. Tjaden, J. van der Greef, *RCMS* **2000**, 14, 1682–1688
- 184 Y. Jiang, P.-C. Wang, L. E. Locascio, C. S. Lee, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2048–2053
- 185 J. H. Chan, A. T. Timperman, D. Qin, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4437–4444
- 186 W.-C. Sung, S.-Y. Huang, P.-C. Liao, G.-B. Lee, C.-W. Li, S.-H. Chen, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3648–3654
- 187 Z. Meng, S. Qi, S. A. Soper, P. A. Limbach *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1286–1291
- 188 S.-H. Chen, W.-C. Sung, G.-B. Lee, Z.-Y. Lin, P.-W. Chen, P.-C. Liao, *Electrophoresis* **2001**, 22, 3972–3977

-
- ¹⁸⁹ J. Kameoka, H. G. Craighead, H. Zhang, J. Henion *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1935–1941
- ¹⁹⁰ Y. Yang, C. Li, J. Kameoka, K. H. Lee, H. G. Craighead *Lab Chip*, **2005**, 5, 869–876
- ¹⁹¹ N. H. Bings, C. Wang, C. D. Skinner, C. L. Colyer, P. Thibault, D. J. Harrison, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3292–3296
- ¹⁹² J. M. Lazar, R. S. Ramsey, S. Sundberg, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3627–3631
- ¹⁹³ Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki, S. Nakamura, *J. Chromatogr. A* **2003**, 1011, 181–192
- ¹⁹⁴ Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki, S. Nakamura, *J. Chromatogr. A* **2004**, 1025, 287–296
- ¹⁹⁵ S. Thorslund, P. Lindberg, P. E. Andrén, F. Nikolajeff, J. Bergquist, *Electrophoresis* **2005**, 26, 4674–4683
- ¹⁹⁶ Y. Yang, J. Kameoka, T. Wachs, J. D. Henion, H. G. Craighead *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2568–2574
- ¹⁹⁷ J. Kameoka, R. Orth, B. Ilic, D. Czaplewski, T. Wachs, H. G. Craighead, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5897–5901
- ¹⁹⁸ B. Zhang, F. Foret, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1015–1022
- ¹⁹⁹ J. Li, J. F. Kelly, I. Chernushevich, D. J. Harrison, P. Thibault, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 599–609
- ²⁰⁰ M. F. Bedair, R. D. Oleschuk, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 1130–1138
- ²⁰¹ J. M. Iannacone, J. A. Jakubowski, P. W. Bohn, J. V. Sweedler, *Electrophoresis* **2005**, 26, 4684–4690
- ²⁰² M. Svedberg, M. Veszelei, J. Axelsson, M. Vangbo, F. Nikolajeff, *Lab Chip* **2004**, 4, 322–327
- ²⁰³ A. Muck, A. Svatos, *RCMS* **2004**, 18, 1459–1464
- ²⁰⁴ T. Sikanen, S. Tuomikoski, R. A. Ketola, R. Kostianen, S. Franssila, T. Kotiaho, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 9135–9144
- ²⁰⁵ S. Le Gac, C. Cren-Olive, C. Rolando, S. Arscott, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 409–412
- ²⁰⁶ S. Tuomikoski, T. Sikanen, R. A. Ketola, R. Kostianen, T. Kotiaho, S. Franssila, *Electrophoresis* **2005**, 26, 4691–4702
- ²⁰⁷ S. Le Gac, C. Rolando, S. Arscott, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, 17, 75–80
- ²⁰⁸ M. Schilling, W. Nigge, A. Rudzinski, A. Neyer, R. Hergenroder, *Lab Chip* **2004**, 4, 220–224
- ²⁰⁹ M. Svedberg, A. Pettersson, S. Nilsson, J. Bergquist, L. Nyholm, F. Nikolajeff, K. Markides, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3934–3940
- ²¹⁰ J. Wen, Y. Lin, F. Xiang, D. W. Matson, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Electrophoresis* **2000**, 21, 191–197
- ²¹¹ V. Gobry, J. V. Oostrum, M. Martinelli, T. C. Rohner, F. Reymond, J. S. Rossier, H. H. Girault, *Proteomics* **2002**, 2, 405–412
- ²¹² J. S. Rossier, N. Youhnovski, N. Lion, E. Damoc, S. Becker, F. Reymond, H. H. Girault, M. Przybylski, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 55–60
- ²¹³ H. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich, T. van de Goor, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 527–533
- ²¹⁴ Yin, H. F.; Killeen, K. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 1427–1434
- ²¹⁵ J. Grym, M. Otevreil, Frantisek Foret, *Lab Chip*, **2006**, 6, 1306–1314
- ²¹⁶ K. Tang, Y. Lin, D. W. Matson, T. Kim, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1658–1663
- ²¹⁷ C.-H. Yuan, J. Shica, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1080–1083
- ²¹⁸ J.-S. Kim, D. R. Knapp, *Electrophoresis* **2001**, 22, 3993–3999
- ²¹⁹ H. Liu, C. Felten, Q. Xue, B. Zhang, P. Jedrzejewski, B. L. Karger, F. Foret, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3303–3310
- ²²⁰ G. A. Schultz, T. N. Corso, S. J. Prosser, S. Zhang, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4058–4063
- ²²¹ J. M. Dethy, B. L. Ackermann, C. Delatour, J. D. Henion, G. A. Schultz, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 805–811
- ²²² S. Zhang, C. K. Van Pelt, J. D. Henion, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3620–3632
- ²²³ D. Petersen, S. Varjo, O. Geschke, M.-L. Riekkola, J. P. Kutter, *Proc. of the Micro-TAS 2002 Symposium* (Hrsg. Y. Baba, S. Shoji, A. van den Berg), Nara, Japan, Nov 3 – 7, 2002, S. 691–693

-
- ²²⁴ G. E. Yue, M. G. Roper, E. D. Jeffery, C. J. Easley, C. Balchunas, J. P. Landers, J. P. Ferrance, *Lab Chip* **2005**, 5, 619–627
- ²²⁵ S. L. S. Freire, H. Yang, A. R. Wheeler, *Electrophoresis* **2008**, 29, 1836–1843
- ²²⁶ E. Hardenborg, A. Zuberovica, S. Ullsten, L. Söderberg, E. Heldin, K. E. Markides, *Journal of Chromatography A*, **2003**, 1003, 217–221
- ²²⁷ S. Ullsten, A. Zuberovic, M. Wetterhall, E. Hardenborg, K. E. Markides, J. Bergquist, *Electrophoresis* **2004**, 25, 2090–2099
- ²²⁸ Dissertation M. Ludwig **2004** / *Universität Siegen und Max-Planck-Institut für Kohlenforschung Müllheim a. d. Ruhr*
- ²²⁹ O. Trapp, E. W. Pearce, J. R. Kimmel, O. Kyu Yoon, I. A. Zuleta, R. N. Zare, *Electrophoresis* **2005**, 26, 1358–1365
- ²³⁰ D. R. Barnidge, S. Nilsson, K. E. Markides, H. Rapp, K. Hjort, *RCMS*, **1999**, 13, 994–1002
- ²³¹ D. R. Smith, T. D. Wood, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 7015–7019
- ²³² X. Zhu, S. Thiam, B. C. Valle, I. M. Warner, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5405–5409
- ²³³ S. Nilsson, M. Wetterhall, J. Bergquist, L. Nyholm, K. E. Markides, *RCMS*, **2001**, 15, 1997–2000
- ²³⁴ M. Wetterhall, S. Nilsson, K. E. Markides, J. Bergquist, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 239–245
- ²³⁵ H. J. Issaq, G. M. Janini, K. C. Chan, T. D. Veenstra, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1053, 37–42
- ²³⁶ M. Herrero, E. Ibañez, A. Cifuentes, *Electrophoresis* **2008**, 29, 2148–2160
- ²³⁷ V. Sanz-Nebot, E. Balaguer, F. Benavente, J. Barbosa, *Electrophoresis* **2005**, 26, 1457–1465
- ²³⁸ E. P. Maziarz, S. A. Lorenz, T. P. White, T. D. Wood, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, 11, 659–663
- ²³⁹ T. P. White, T. D. Wood, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3660–3665
- ²⁴⁰ R. T. Kelly, K. Tang, D. Irimia, M. Toner, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3824–3831
- ²⁴¹ J. C. Severs, A. C. Harms, R. D. Smith, *RCMS*, **1996**, 10, 1175–1178
- ²⁴² J. Gao, J. Xu, L. E. Locascio, C. S. Lee, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2648–2655
- ²⁴³ I. M. Lazar, R. S. Ramsey, S. C. Jacobson, R. S. Foote, J. M. Ramsey, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 892, 195–201
- ²⁴⁴ D. R. Turner, US-Patent **4.469.554**, **1983**
- ²⁴⁵ Diplomarbeit M. Eschner **2007** / Universität Regensburg
- ²⁴⁶ Masterarbeit S. Fritsche **2008** / Universität Leipzig
- ²⁴⁷ M.S. Kriger, K.D. Cook, R.S. Ramsey, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 385
- ²⁴⁸ N. Hajduková, M. Procházka, J. Štěpánek, M. Špírková, *Colloid Surface Physicochem Eng Aspect* **2007**, 301, 264
- ²⁴⁹ D.R. Barnidge, S. Nilsson, K.E. Markides, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4115
- ²⁵⁰ Y.R. Chen, G.R. Her, *RCMS* **2003**, 17, 437
- ²⁵¹ T. M. Annesley, *Clinical Chemistry* **2003**, 49, 1041–1044
- ²⁵² P. Hoffmann, M. Eschner, D. Belder, *Anal. Chem.* **2009**, *submitted*
- ²⁵³ <http://www.roempp.com/prod/index1.html> / Stand April **2009**
- ²⁵⁴ P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman „Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler“ *Georg Thieme Verlag Stuttgart* **1994**/ ISBN 3-13-357814-6
- ²⁵⁵ H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt „Kapillarelektrophorese“ *Vieneg Verlag* **1994** / ISBN 3528065974
- ²⁵⁶ M. Gilges, M. H. Kleemiss, G. Schomburg, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2038–2064
- ²⁵⁷ H. Lindner, W. Helliger, A. Dirschl Mayer, M. Jaquemar, B. Puschendorf, *Biochem. J.* **1992**, 283, 467–471
- ²⁵⁸ Persönliche Kommunikation mit G. Besselink (Capilix/Niederlande) / **September 2007**

-
- ²⁵⁹ C. S. Henry „Microchip Capillary Electrophoresis” *Humana Press* **2006** / ISBN 1597450766 S. 187 ff
- ²⁶⁰ X8050-Glas-Chips mit 50 µm Kanalbreite und 20 µm Kanaltiefe von Micronit Microfluidics BV (Niederlande).
- ²⁶¹ N. Lion, F. Reymond, H. H Girault, J. S. Rossier, *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, 15, 31–37
- ²⁶² J. Krenkova , F. Foret, *Electrophoresis* **2004**, 25, 3550–3563
- ²⁶³ Y. L. Baohong, L. P. Yang, H. H. Girault, *Anal Bioanal Chem* **2008**, 390, 227–229
- ²⁶⁴ C. Dass „Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry” *Wiley-Interscience* **2007**/ ISBN 9780471682295
- ²⁶⁵ D. Janasek, J. Franzke, A. Manz, *NATURE* **2006**, 442, 374–380
- ²⁶⁶ EMBL-Heidelberg, www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/homepage.html. / Stand November **2006**
- ²⁶⁷ F. M. Matysik, C. Neusüß, M. Pelzing, *Analyst* **2008**, 133, 1764–1766
- ²⁶⁸ M. Pelzing, C. Neusüß, *Electrophoresis*, **2005**, 26, 2717–2728